



Atelier

Techniques d'investigation appliquées au diagnostic des pathologies mitochondriales

Institut Cochin – Paris   17-19 Octobre 2013

Accueil 3ème étage Faculté de Médecine - pièce 3529

PLANNING - Atelier MeetOchondrie

"Techniques d'investigation appliquées au diagnostic des pathologies mitochondriales"

Paris 17-19 octobre 2013
GDR 3159 CNRS "Réseau MeetOchondrie"

	Jeudi 17	Vendredi 18				Samedi 19 8h00			
De 8h30 à 12h30	**Mise en place (intervenants)**	**A : gr 1**	**B : gr 2**	**C : gr 3**	**D : gr 4**	**A : gr 3**	**B : gr 4**	**C : gr 1**	**D : gr 2**
12h30- 14h	**Accueil des participants – Plateau repas**	**Plateau repas**				**Plateau repas 12h-13h reprise à 13h !**			
De 14h à 18h	**Exposés théoriques**	**A : gr 2**	**B : gr 1**	**C : gr 4**	**D : gr 3**	**A : gr 4**	**B : gr 3**	**C : gr 2**	**D : gr 1**
De 19h à 20h30	**Dîner FIAP**	**Dîner FIAP**				**Fin à 17h00 !**			

4 groupes de participants : **1, 2, 3, 4**
4 ateliers : **A, B, C, D**

A : Respiration cellulaire (N. Gueguen, C. Wetterwald) **Pièce 3012**
B : Activités des complexes respiratoires (C. Rocher, S. Allouche) **Pièce 3512**
C : Quantification de l'ADNmit (B. Mousson de Camaret, V. Desquiret) **Pièce 3012**
D : Analyse histologique de la chaîne respiratoire (A. Lombès, V. Lenoir) **Pièce 3514**

LISTE DES PARTICIPANTS

ABRIAL **Maryline**	maryline_abrial_1@hotmail.com	Lyon	gr1
BONY-GARAYT **Claire**	claire.bony@inserm.fr	Montpellier	gr1
CORTI **Olga**	olga.corti@upmc.fr	Paris	gr1
CROCHEMORE **Clément**	clement.crochemore2@univ-rouen.fr	Rouen	gr1
DALOYAU **Marlène**	marlene.daloyau@univ-tlse3.fr	Toulouse	gr2
DUROUX-RICHARD **Isabelle**	isabelle.richard@inserm.fr	Montpellier	gr2
HARDONNIERE **Kévin**	kevin.hardonniere@univ-rennes1.fr	Rennes	gr2
HOET **Delphine**	delphine.hoet@sanofi.com	Vitry-sur-Seine	gr2
LAMBERT **Mireille**	mireille.lambert@inserm.fr	Paris	gr3
MAHMUDI **Nasire**	nasire.mahmudi@sanofi.com	Chilly-Mazarin	gr3
MALGOYRE **Alexandra**	alexandra.malgoyre@irba.fr	Brétigny-sur-Orge	gr3
PANOZZO **Cristina**	panozzo@cgm.cnrs-gif.fr	Gif-sur-Yvette	gr3
PECQUEUR-HELLMAN **Claire**	claire.pecqueur@univ-nantes.fr	Nantes	gr4
RENVOISE **Margaux**	margaux.renvoise@cea.fr	Gif-sur-Yvette	gr4
ROUBERT **Christine**	christine.roubert@sanofi.com	Montpellier	gr4
ZOUYENE **Nidya**	nidya.zouyene@sanofi.com	Toulouse	gr4

ENCADRANTS

Noms	Email
Naig Gueguen	NaGueguen@chu-angers.fr
Céline Wetterwald	CeWetterwald@chu-angers.fr
Christophe Rocher	crocher@u-bordeaux2.fr
Stéphane Allouche	allouche-s@chu-caen.fr
Bénédicte Mousson de Camaret	benedicte.mousson-de-camaret@chu-lyon.fr
Valérie Desquiret	VaDesquiret@chu-angers.fr
Anne Lombès	anne.lombes@inserm.fr
Véronique Lenoir	veronique.lenoir@inserm.fr

ATELIER A

Respiration cellulaire : analyse de la chaîne respiratoire par oxygraphie

Naig GUEGUEN et Céline WETTERWALD

Pièce 3012

ANALYSE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE PAR OXYGRAPHIE
(FIBROBLASTES PERMEABILISES)

1 : Objet

Ce **Mode Opératoire** explique comment analyser les respirations maximales liées aux différents segments (complexes) de la chaîne respiratoire sur fibroblastes perméabilisés.

Cette Analyse se fait sur oxygraphe Oroboros (02k).

La perméabilisation des fibroblastes se fait selon le protocole de Greco et al., 1996 ; le tampon de respiration et les concentrations en substrats correspondent à ceux de Rustin et al., 1994.

2 : Rappels généraux

La phosphorylation oxydative :

La chaîne respiratoire transfère les électrons du NADH (à partir du complexe I) ou du FADH (complexe II / ETF) à l'oxygène.

La membrane interne est imperméable au NADH et au FADH2. Le pouvoir réducteur interne ne peut donc venir que du métabolisme matriciel (navettes, oxydation du pyruvate, cycle de Krebs) alimenté par des substrats externes spécifiques.

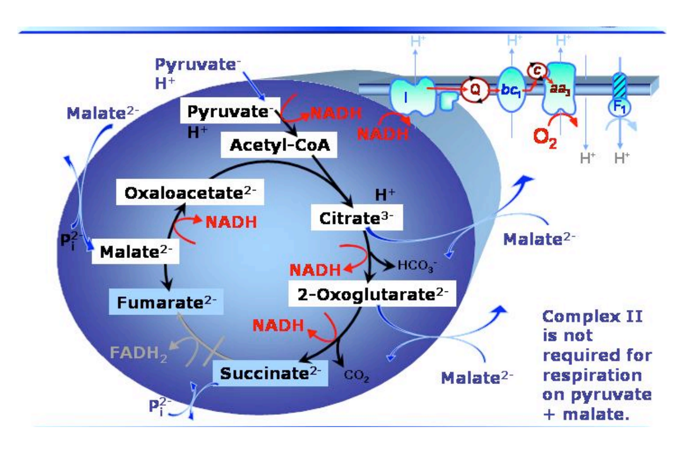
Le transfert des électrons par la chaîne respiratoire est couplé à un transport vectoriel de protons. Dans les mitochondries intactes, ceci s'accompagne de la formation d'une différence transmembranaire de potentiel électrochimique du proton appelée plus simplement force protomotrice. Celle-ci freine le flux d'électrons qui lui donne naissance, c'est le contrôle respiratoire.

A l'état stationnaire, le flux actif transmembranaire de protons (transfert par la chaîne respiratoire) est égal au flux passif (retour vers la matrice mitochondrial). Ce dernier est dû à des fuites de protons et à la synthèse d'ATP. A l'équilibre synthèse/hydrolyse d'ATP, par exemple en absence d'ADP, il n'y a pas de flux net de protons associé à la synthèse d'ATP, mais simplement à la fuite de protons. La force protomotrice est maximale et la chaîne respiratoire est freinée au maximum : c'est l'état 4. Si l'on ajoute de l'ADP, on déplace l'équilibre et la synthèse d'ATP démarre, ce qui diminue la force protomotrice et accélère le flux respiratoire : c'est l'état 3. La synthèse d'ATP s'arrête lorsque l'équilibre est à nouveau atteint (nouvel état 4), par exemple après inhibition de l'ATP synthase par de l'oligomycine. On a alors à nouveau une forte valeur de la force protomotrice et une faible valeur du flux respiratoire. Enfin, si l'on ajoute un découplant qui rend la membrane perméable aux protons, (tel que le FCCP), la force protomotrice s'effondre et la respiration s'emballe pour attendre son niveau maximum pour un substrat donné.

Les apports en substrats :

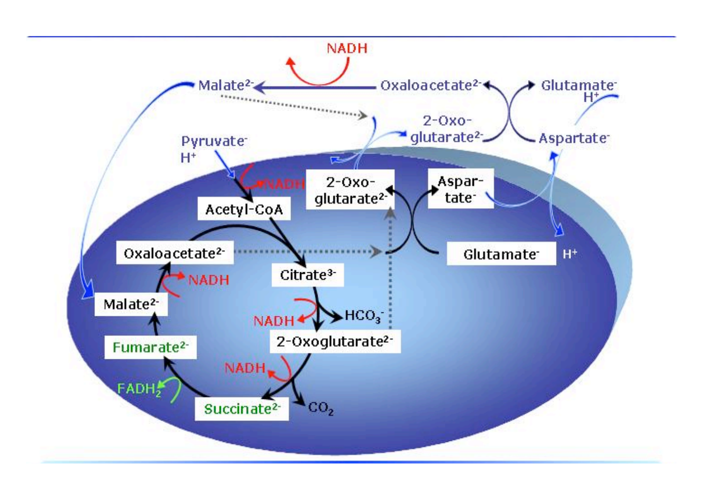
Complexe I, malate + pyruvate :

Le pyruvate permet l'aprrovisionnement
Du cycle de Krebs en acetylCoA.
Cette décarboxylation est dépendante de l'activité
De la PDH.
L'entré de malate s'effectue contre la sortie d'
oxoglutarate et citrate (transporteur dicarboxylate),
« by-passant » ainsi la formation
de succinate, et donc le complexe II.



Complexe I, malate + pyruvate + glutamate :

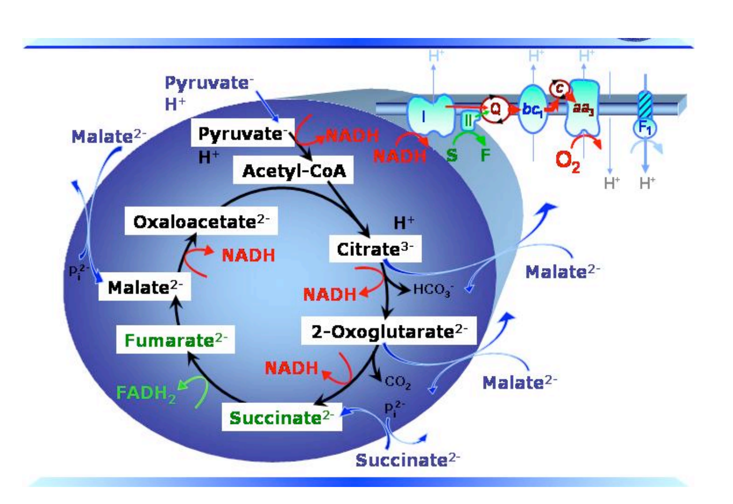
Le glutamate permet également le fonctionnement du cycle de Krebs. Son entrée n'est pas contrôlée par la PDH, par contre, elle est dépendante du potentiel de membrane.



Complexe I + II, malate + pyruvate + succinate :

En présence de succinate, le cycle de Krebs reprend avant le complexe II, les complexes I et II peuvent oxyder leur substrat et le cycle est pratiquement complet.

L'ajout de roténone inhibe le complexe I. L'accumulation de NADH en résultant entraîne une accumulation d'acétylCoA qui inhibe la PDH. Le succinate entre en échange de Pi.



L'analyse par oxygraphie :

L'analyse par oxygraphie permet de mesurer la consommation d'oxygène à l'aide d'une électrode de Clark. Sur cellules perméabilisées ou mitochondries isolées, l'apport en substrats à la chaîne respiratoire peut être contrôlé afin de cibler les différents états respiratoires et les différents complexes de la chaîne et tester ainsi les respirations maximales liées aux différents complexes.

Cependant, les résultats ont montré que, dans la plupart des cas, la manifestation phénotypique de l'anomalie génétique se produit lorsqu'un seuil est dépassé, et ce phénomène a été nommé «l'effet de seuil phénotypique » (pour revue, cf Rossignol et al., 2003). Ceci signifie qu'il est parfois possible d'inhiber considérablement l'activité d'un complexe de la chaîne respiratoire, jusqu'à une valeur critique, sans affecter la vitesse de respiration maximale ou la synthèse d'ATP. Ce phénomène est appelé «effet de seuil biochimique ». Ceci est en particulier le cas pour le complexe IV (cytochrome oxidase), dernier complexe de la chaîne respiratoire et dont l'activité est donc en excès par rapport à celle des autres complexes.

Ces effets de seuil peuvent être très différents d'un tissu à l'autre (ex. muscle versus fibroblastes pour le complexe IV, muscle ou fibroblastes versus foie pour le complexe I), et très différents également en fonction de la mutation impliquée (par exemple, les mutations dans des sous-unités du complexe I impliquées dans la translocation de protons ne modifie que peu l'activité catalytique de l'enzyme isolée, mais conduisent généralement à une diminution de la consommation d'oxygène).
D'autre part, les études oxygraphiques peuvent permettent de détecter non seulement des déficits de la phosphorylation oxydative, mais également des déficits en pyruvate déshydrogénase, en enzyme du cycle de Krebs…toutes ces anomalies conduisant à une diminution de la production des équivalents réduits utilisés par la mitochondrie.

2 : Préparation des réactifs

2-A) Liste et référence des réactifs :

- **ADP**	SIGMA, A7699
- **Antimycine A**	SIGMA, A8674
- **Ascorbate**	SIGMA, A7631.
- **Azide**	SIGMA, S2002
- **BSA**	SIGMA, A6003
- **Cytochrome c**	SIGMA, C7752
- **Digitonine**	SIGMA, D141
- **FCCP**	SIGMA, C2920
- **Glutamate**	SIGMA, G1251
- **KCl**	SIGMA, P3911
- **KCN**	SIGMA, 20781-0
- **KH2PO4**	SIGMA, P9791
- **Malate**	SIGMA, M1000
- **Mannitol**	SIGMA, M9647
- **MgCl2**	SIGMA, M1028
- **NAD^+**	ROCHE, 10127965001
- **Oligomycine**	SIGMA, O4876
- **Pyruvate**	SIGMA, P5280
- **Roténone**	SIGMA, R8875
- **Succinate**	SIGMA, S3674
- **TMPD**	SIGMA, T7394

2-B) Périodicité :

La solution mère de respiration est stable trois mois à 4°C, le tampon de respiration contenant de la BSA est stable 1 mois.

Les substrats et inhibiteurs se préparent tous les trois mois, exceptés le KCN, le FCCP, l'antimycine A et l'oligomycine à préparer tous les mois.

Tous les inhibiteurs dilués dans l'éthanol sont à conserver en tubes à bouchon à vis avec joint pour éviter toute fuite ou évaporation.

2-C) Tampon de respiration

Tampon de respiration sans BSA :

		qsp 500 ml
- KH_2PO_4	10 mM	681 mg
- Mannitol	300 mM	2733 mg
- KCl	10 mM	373 mg
- $MgCl_2$	5 mM	2.50 ml

Ajuster le pH à 7.4 avec du KOH
conservation 3 mois à 4°C.

Tampon de respiration + BSA :

- BSA	1 mg/ml	50 mg

QSP 50 ml de tampon Rustin sans BSA
conservation 1 mois à 4°C.

2-D) Préparation des substrats et inhibiteurs :

à diluer dans l'H_2O milliQ, sauf cas spécifiques indiqués.

- **Pyruvate**	0,5 M	*stabilité 3 mois à -20°C*
- **Malate**	0,5 M	*amener à pH 7 avec du KOH, stabilité 3 mois à -20°C*
- **Glutamate**	0,5 M	*amener à pH 7 avec du KOH, stabilité 3 mois à -20°C*
- **Succinate**	0,5 M	*amener à pH 7 avec du KOH, stabilité 3 mois à -20°C*
- **Cytochrome c**	320 µM	*aliquoter en 120 µl, stabilité 3 mois à -20°C*
- **Roténone**	2,5 mM	*diluer dans l'EtOH 100, conservation 3 mois à -20°C*
- **FCCP**	1 mM	*diluer au 1/40ème la solution mère, conservation 1 mois à -20°C*
- **Oligomycine**	8 mg/ml	*diluer dans l'EtOH, stabilité 1 mois à -20°C*
- **Antimycine A**	1 mg/ml	*diluer dans l'éthanol à partir de la solution mère à 10 mg/ml, stabilité : 1* ***mois*** *à* ***-20°C***
- **KCN**	200 mM	*stabilité 1 mois à -20°C*
- **Azide**	100 mM	*stabilité 1 mois à -20°C*

A préparer le jour même :

- **ADP**	0,15 M	*Stabilité :* ***1 jour*** *à* ***4°C***
- **Ascorbate**	0,4 M	*diluer dans l'eau au dernier moment.* *Stabilité :* ***10 minutes une fois repris***
- **NAD^+**	50 mM	*Stabilité :* ***1 jour*** *à* ***4°C***
- **Digitonine**	5 mg/ml	*Peser dans un cryotube à joint, pas plus de 3 mg* *Préparer le jour même, diluer dans l'eau.* *Chauffer à* ***95°C*** *pendant* ***2 minutes 30****.* *Stabilité :* ***½ journée à température ambiante***
- **TMPD** (cellules)	20 mM	*Chauffer à* ***37°C à l'avance****.* *Stabilité :* ***½ journée***

Exceptionnellement :

- Palmytoylcarnitine	20 mM	*diluer dans ½ EtOH, ½ eau, stabilité 1 mois à -20°C*
- Octanoylcarnitine	20 mM	*diluer dans ½ EtOH, ½ eau. stabilité 1 mois à -20°C*

Aliquoter les différents substrats pour chaque jour de manipulation, et conserver à -20°C.
Ne pas recongeler les aliquots.

3 : Préparation du matériel

3-A) Précautions particulières :

Pendant les oxygraphies, porter des gants nitriles : Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont des toxiques !

3-B) Automate et/ou petits matériels :

- Oxygraphe O2K
- Block chauffant (Bain-sec) Bioblock
- Agitateur à bascule bioblock

3-C) Préparation des réactifs :

Equilibrer les tampons de respiration sans et avec BSA à température ambiante.

Sortir à l'avance et conserver sur la glace :

Substrats : malate 0.5M,
pyruvate 0.5M,
succinate 0.5M
glutamate 0.5M

Inhibiteurs : Roténone 2.5 mM,
antimycine 1 mg/ml,
oligomycine, 8 mg/ml,
KCN 0.2 M,
Azide 100 mM,
FCCP 1 mM

Allumer le bloc chauffant à 95°C.

3 : Calibration des oxygraphes :

Allumer l'ordinateur puis l'oxygraphe. Quand tous les voyants sont allumés, double cliquer sur l'icône « **Datlab 4** ».

La fenêtre « **oxygraph setup** » doit s'ouvrir directement, sinon **F7** (cette touche permet à tout moment de connecter/déconnecter l'oxygraphe). Sélectionner le type d'analyse désiré : **37°C, agitation à 750 rpm** (pour cellules ou mitochondries isolées). Cliquer sur « ***connect*** ».

La fenêtre "**Edit Experiment**" apparaît : **Vérifier les facteurs A0 et B0 renseignés et corrigés ci-besoin** (cf fiche de maintenance des oxygraphes).

Vider les chambres et les laver à l'EtOH 100. Rincer ensuite soigneusement à l'eau bidistillée puis remplir les chambres de **2 ml de tampon Respiration sans BSA**. Fermer complètement les chambres et ajouter 100 µl de solution saturée en dithionite pour obtenir le 0% oxygène. Quand le flux est stable, rincer soigneusement l'oxygraphe à l'eau distillée puis ajouter **1.9 ml de tampon Rustin + BSA**. Laisser le flux se stabiliser chambres ouvertes pour obtenir le 100%.

Faire une marque au 100 % O_2 (sur une zone où le flux est stable) en appuyant sur shift + clic gauche sur la souris et faire glisser la souris jusqu'à la taille de marque désirée. Marquer de la même façon le zéro. Cliquer en haut sur la marque pour la nommer (100 ou 0).

F5 pour effectuer la calibration.

- la chambre active (sur laquelle va s'effectuer la calibration) est celle en blanc, où apparaît le logo Oroboros.
- ***Air calibration*** : rentrer le nom de la marque correspondant au 100 % O_2.
- ***Zéro calibration*** : rentrer le nom de la marque du zéro. Le voltage correspondant, la température et la pression en oxygène doivent s'afficher automatiquement.
- ***O2 solubility factor of medium*** : **à 37°C**, 0.834 pour le tampon Rustin (toutes les valeurs en fonction de la température sont indiquées dans la table **« oxygen solubility in experimental media** » du manuel Oroboros).
- Cliquer sur **Calibrate**.

- Sélectionner la deuxième chambre en cliquant dessus, puis recommencer la même opération (F5).

- Dans l'onglet en bas de l'écran, choisir "**flux per volume corrected**".

4 : Préparation des cellules : *A température ambiante !*

Chauffer la digitonine diluée dans l'eau à **95°C** pendant **2 minutes 30**, agiter et la laisser refroidir à température ambiante.

Trypsiner les cellules (3 à 5 millions de cellules par oxygraphie, en double, soit 2 T75), Stopper la trypsine avec du PBS-5 % SVF, compter et centrifuger à 800 rpm, 5 minutes. Retirer le PBS-SVF, et conserver les cellules en culot sec.

Reprendre le culot sec cellulaire avec **50 µl/10^6 cellules** de tampon de respiration **– BSA.**

Ajouter **15 µg** (soit 3 µl) de digitonine **par 10^6 cellules ; i**ncuber sous agitation douce (agitateur à bascule) pendant **2 minutes 30**.

Ajouter **QSP 4 volumes** de tampon de respiration **+ BSA.**

Centrifuger à **800 g**, pendant **2 minutes 30**.

Reprendre les cellules dans **200 µl** de tampon de respiration **+ BSA.**

5 : Oxygraphie

Cliquer sur F7 pour déconnecter/ reconnecter l'oxygraphe. Sélectionner le type d'analyse désiré : **37°C** (pour cellules ou mitochondries isolées). Cliquer sur « ***connect*** ».

La fenêtre "**Edit Experiment**" apparaît : **Indiquer le nom du patient dans l'onglet titre,** puis le nombre de cellules, le tampon utilisé…

Injecter les **200 µl** de suspension cellulaire dans la cuve, adapter le capuchon doucement et vérifier l'absence de bulles dans la chambre.

Ajouter **10 µl** de pyruvate (2.5 mM) puis **20 µl** de Malate (5 mM). *(substrats du complexe I)*
Attendre 2-3 minutes au moins la stabilisation du flux (ligne rouge).

Introduire **20 µl** de NAD^+ (0.50 mM) puis **20 µl** d'ADP (1.50 mM). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(activation de la phosphorylation)*

Ajouter **25 µl** de cytochrome c (4 µM). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(intégrité membranaire)*

Ajouter **20 µl** de glutamate (5 mM). Attendre la stabilisation du flux (ligne rouge). *(complex I)*

Introduire **40 µl** de succinate (10 mM). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(complexe II)*

Introduire **4 µl** de roténone (5 µM). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(inhibition du complexe I)*

Ajouter **2 µl** d'oligomycine (8 µg/ml). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(inhibition ATP synthase)*

Ajouter **2 µl** de FCCP (1 µM). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(découplant)*

Introduire **4 µl** d'Antimycine (2 µg/ml). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. *(inhibition du complexe III)*

Introduire **20 µl** d'Ascorbate (4 mM), dès que le flux est stable, ajouter **20 µl** de TMPD (0.3 mM). (complexe IV).

Dès que le flux est stable, Introduire **20 µl** de KCN (2 mM), et **20 µl** d'Azide (1 mM). Attendre d'obtenir un plateau pour le flux. (inhibition du complexe IV)

A la fin de la séquence, prélever **4x400 µl** dans chaque chambre et placer dans un tube Eppendorf pour le dosage des protéines par la méthode **PRBCA** (voir **BIO-9014-0147**: dosage des protéines par la méthode B.C.A.).

Rincer les cuves (eau puis éthanol 100) et remettre **2 ml** d'EtOH 100. Rincer soigneusement les bouchons avec de l'eau puis de l'EtOH 100 et les laisser sur les chambres pour éviter l'évaporation de l'EtOH.

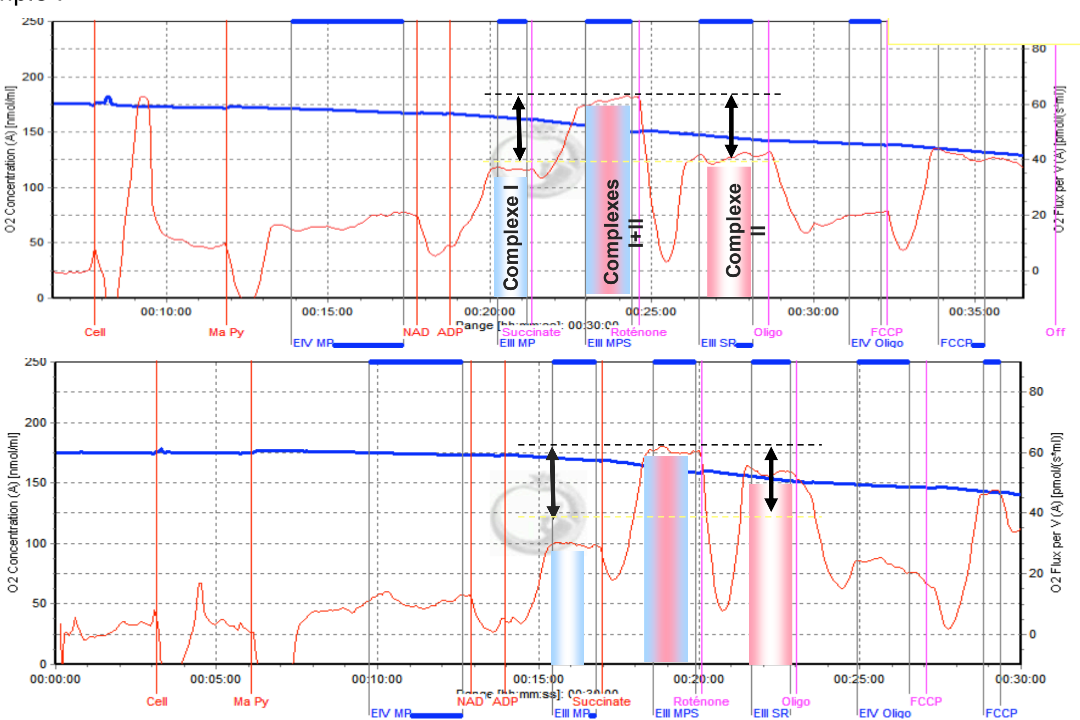
Centrifuger les aliquots prélevés, 1 minute à 16000g. Retirer le surnageants et laver le culot avec du NaCl 0,9% vol/vol. Doser ensuite les protéines sur les différents aliquots. Si le disage ne peut être réalisé immédiatement, congeler à **-20°C**.

6 : Analyse de l'expérience

En bas de l'écran, dans l'onglet graphique, vérifier que le graphique est bien en "**corrected**" " **5 – Flux per Volume corrected**".

Tracer une marque sur chaque palier d'intérêt, au niveau où le flux est stable en appuyant sur shift + clic gauche sur la souris, et faire glisser la souris jusqu'à la taille de marque desirée. (Pour enlever la marque, shift + clic droit et repasser sur la marque à l'envers, de la droite vers la gauche.)

Exemple :



Cliquer sur le graphique de la chambre d'intérêt, puis "**F2**". Les résultats apparaissent pour cette chambre **(les résultats indiqués pour la chambre non active ne veulent rien dire !!)**.
Copier ensuite les données dans Excel : Cliquer sur "**copy to clipboard**" et coller dans un fichier Excel. Le graphique peut également être exporté : Cliquer sur l'onglet "**Graph**" / **copy to clipboard** / **BMP**. Il peut alors être collé dans Excel, ou Powerpoint …

Les analyses ou copies peuvent également être réalisées en cours de mesures, ou ultérieurement en ré-ouvrant le graphique (**File**/**Open**).

Corriger les valeurs obtenues par le dosage de protéines. Ces valeurs sont alors en pmol/s/mg de protéines. Les convertir en nmol/min/mg de protéines (soit multiplier par 1000 et diviser par 60).

Calculer la respiration liée au complexe IV = Respirations en présence de TMPD – ascorbate

Calculer ensuite les RCR (ratio de contrôle respiratoire) en présence des différents substrats :
- EIII malate+pyruvate / EIV Malate+pyruvate (respiration avant l'ajout d'ADP)
- EIII succinate+roténone / oligo succinate+roténone

La stimulation éventuelle par le cytochrome c :
- Cyt c / EIII SR

La stimulation par le FCCP
- FCCP / EIII SR

Les ratios des différentes respirations maximales entre elles :
- EIII SR / EIII MP
- EIII MPS / EIII MP
- COX / EIII MP
- COX / EIII SR

7 : Documents associés

- Manuel d'utilisation de l'oxygraphe Oroboros (site web : www.oroboros.at)
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta. 228(1):35-51.
- Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, Gellerich FN. (1997). High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders.
Mol Cell Biochem. 174(1-2):71-8.
- Pesta D, Gnaiger E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. Methods Mol Biol. 2012;810:25-58.

ATELIER B

Dosage spectrométrique des activités des complexes de la chaîne respiratoire

Christophe ROCHER et Stéphane ALLOUCHE

Pièce 3512

Préparation des échantillons tissulaires pour les dosages des complexes de la chaîne respiratoire

Principe :

- Dans le cadre du diagnostic des maladies mitochondriales, les activités des complexes de la chaîne respiratoire sont mesurées régulièrement sur des fragments de muscle, foie, des fibroblastes cutanés en culture, ou des lymphomonocytes isolés sur Ficoll. Tous ces échantillons doivent avoir été congelés de façon très rapide (cf protocole prélèvement et conservation). Ils ne doivent pas avoir été exposés à une rupture de la chaîne du froid.
- Toutes les manipulations sont réalisées en chambre froide.
- Les prélèvements sont conservés en tubes à -80°C. Ils doivent être transportés dans la carboglace.

En pratique :

- 5 échantillons de patients peuvent être analysés au cours d'une même série. Un échantillon de mitochondries isolées de cœur de bœuf est toujours analysé en parallèle et sert de témoin interne de la qualité des dosages.
- Préparer **2 séries** de 5 tubes Eppendorf de 1,5 mL numérotés, et les placer dans la glace pilée
- **Foie et muscle : Homogénat à 5% dans le tampon "Mannitol"** :

  1) Mettre les 5 tubes d'homogénéisateur de type Potter verre-verre (taille 20 chez Kontes) à refroidir dans la glace pilée.

  2) Prendre une petite quantité du fragment biopsique (20 à 50 mg)

  Si besoin, couper le fragment de biopsie en évitant sa décongélation :

  - Soit en le coupant au scalpel

    Refroidir une boite en plastique en la posant sur la carboglace,

    Y déposer le fragment biopsique sur un papier d'aluminium,

    Remonter les bords du papier d'aluminium de chaque coté du fragment ,

    Couper à l'aide d'un scalpel en maintenant le fragment avec une pince.
  - Soit en le cassant dans un mortier refroidi à l'azote liquide

  3) Le placer dans l'homogénéisateur de type Potter

  4) Ajouter 9 volumes de tampon « Mannitol » (par exemple 270 µL pour 30 mg de biopsie ou 450 µL pour 50 mg)

  5) Homogénéiser en chambre froide (ou dans la glace pilée) à l'aide du piston en verre rodé à bout conique, à une vitesse de 500 à 1000 RPM en 3 à 5 passages. Il est important d'éviter la surchauffe de l'échantillon.

  6) Transférer le broyat à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube 1,5 mL Eppendorf de la première série de tubes numérotés.

  7) Centrifuger à 0-4°C pendant 20 min à 650 g (soit 2000 RPM pour la centrifugeuse de paillasse).

  8) RANGER LE RESTE DE LA BIOPSIE AU CONGELATEUR

  9) Transférer le surnageant dans le tube Eppendorf 1,5 mL correspondant dans la deuxième série de tubes numérotés.

  10) Reprise du culot dans le volume de tampon « Mannitol » utilisé initialement, transfert dans le tube de l'homogénéisateur de type Potter utilisé initialement, et seconde homogénéisation dans les mêmes conditions.

  11) Centrifugation à 0-4°C pendant 20 min à 650 g (2000 RPM, centrifugeuse de paillasse).

  12) Le surnageant de cette deuxième centrifugation est ajouté à celui obtenu après la première centrifugation. On obtient « un surnageant dit post nucléaire à 5% final »

  13) Les tubes contenant le surnageant sont ensuite gardés dans un portoir réfrigéré pour toute la durée des dosages.

- **Suspension cellulaire dans le tampon "Mannitol" (culots de fibroblastes ou de cellules mononucléées sanguines)**
  Resuspendre le culot cellulaire conservé congelé dans le tampon "Mannitol" (par exemple le culot correspondant à une flasque T75 de fibroblastes peut être repris dans 200 µL de tampon)
  Sonication brève (5 secondes) à puissance modérée pour obtenir une solution homogène.

- **Mitochondries de cœur de bœuf utilisées comme contrôle de qualité dans chaque série de dosages**
  On utilise les "billes de mitochondries" fournies par le Prof. Joël Lunardi de Grenoble.
  Dans un tube 1,5 mL Eppendorf, mettre une bille et la laisser décongeler à 4°C.
  Préparer la dilution des mitochondries au **1/200** dans le tampon "Mannitol" : d'abord dilution 1/40 (10 µL de suspension mitochondriale dans 390 µL) puis dilution 1/5 (200 µL de dilution 1/40 dans 800 µL de tampon). Cette dilution au 1/200 est utilisée pour tous les dosages sauf ceux du complexe III et du complexe IV où l'on utilise une dilution au 1/800 (50 µL de la dilution 1/200 dans 150 µL de tampon "Mannitol").

- **Dosage des protéines**
  On doit doser les protéines des différents surnageants tissulaires ou des suspensions cellulaires (dilués 1/5 dans du PBS) et de la suspension de mitochondries diluée au 1/40 (mesurée pure).
  Ce calcul permet :
    - d'ajuster la concentration protéique à 2 mg/mL
    - et de vérifier la concentration des billes au 1/40 (elle est proche de 1 mg/mL).

Réactifs pour dosages des complexes de la chaîne respiratoire

DOSAGES DE 5 ECHANTILLONS ET UN CONTROLE

REACTIFS A PREPARER LE JOUR MEME

Réactifs	Reconstitution	Rangement
100 µM cytochrome c réduit (Poudre Sigma C-7752 ; FW 12384, corrigé 12900)	Peser au moins 15 mg de cytochrome c et les diluer dans du 50 mM K phosphate pH 7,0 à raison de 0,930 mL/mg puis réduire la préparation (cf protocole complexe IV)	Congélateur –20°C
1 mM cytochrome c (Poudre Sigma C-7752 ; FW 12384, corrigé 12900)	Peser au moins 20 mg de cytochrome c (si l'on ne dose pas l'activité I+III, sinon au moins 30 mg), les diluer dans de l'eau distillée à raison de 75,3 µL/mg	Congélateur –20°C
10 mM oxaloacétate (Poudre Sigma O-4126 ; FW 132,1 corrigé 134,8)	Peser au moins 2 mg d'oxalo-acétate et les diluer dans du 0,1 M Tris HCl pH 8,1 à raison de 0,758 mL/mg	Congélateur –20°C
2 mM NADH (Poudre Sigma N-8129 ; FW 709,4, corrigé786,8)	Peser au moins 2 mg de NADH et les diluer dans de l'eau distillée.à raison de 0,685 mL/mg	Réfrigérateur
100% dithionite ou hydrosulfite de sodium (Poudre Sigma S-1256 ; FW 174.1, corrigé197,8)	Peser au moins 200 mg de dithionite et les diluer dans de l'eau distillée à raison de 1 µL/mg. Faire chauffer au bain Marie bouillant jusqu'à dissolution complète et s'en servir immédiatement pour la réduction de la décylubiquinone.	Dessicateur, température ambiante
21,3 mM décylubiquinol (Poudre Sigma D-7911 ; FW 322,4 corrigé 329,0)	Réduire un aliquote de 176 µL de 25 mM décylubiquinone gardé au congélateur en ajoutant 30 µL de solution de 100% dithionite (voir ci dessus). Agiter au vortex puis incuber à 37°C (bain Marie, la solution doit devenir blanche avec la réduction de la décylubiquinone en 15 à 20 min)	Congélateur -20°C
10 mM KCN (Poudre Fluka 60179 ; FW 65,12)	Peser un grain de KCN et le diluer dans de l'eau distillée à raison de 1,536 mL/mg	Armoire "Poisons", température ambiante

RÉACTIFS GARDÉS CONGELÉS Ă –20°C

Réactifs	Reconstitution	Rangement
5 mM DTNB (Poudre Sigma D-8130; FW 396,3)	Peser du DTNB et le dissoudre dans l'éthanol 95% à raison de 0,505 mL/mg. Aliquotes de 500 µL	Poudre dans le dessiccateur à température ambiante
10 mM acétylCoA (Poudre Sigma A-2181; FW 827,4 corrigé 891,4)	Peser l'acétylCoA et le diluer dans l'eau distillée à raison de 0,112 mL/mg	Poudre au congélateur -20°C
25 mM décylubiquinone (Poudre Sigma D-7911; FW 322,4 corrigé 329,0)	Ajouter 1,216 mL de DMSO dans un flacon de 100 mg (aspect liquide): solution à 250 mM. Puis diluer 1/10 avec du DMSO pour atteindre la concentration de 25 mM. Aliquoter en deux volumes différents : 88 et 176 µL.	Poudre au congélateur -20°C
200 mM succinate (Poudre Sigma S-7501; FW 118,1)	Peser 472,4 mg et les diluer dans 15 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 7, 4 puis compléter le volume à 20 mL. Aliquotes de 500 µL.	Poudre dans le dessiccateur à température ambiante
50 mg/mL albumine bovine, sans acides gras (Poudre Sigma A-2153)	Peser la poudre d'albumine et la diluer dans de l'eau distillée à raison de 20 µL/mg. Aliquotes de 1 mL	Poudre au réfrigérateur
2,5 mg/mL antimycine A (Poudre Sigma A-8674)	Diluer la poudre d'antimycine A d'un flacon dans l'éthanol à 95% à raison de 0,4 mL/mg	Poudre au congélateur -20°C
2,5 mM roténone (Poudre Aldrich R200-1; FW 394,4)	Peser la poudre de roténone et la diluer dans le mélange éthanol 95%/DMSO (50/50) à raison de 1,014mL/mg. Aliquotes de 200 µL.	Poudre au congélateur -20°C

RÉACTIFS GARDÉS AU RÉFRIGÉRATEUR

Réactifs	Reconstitution	Rangement
5 mM DCPIP (2,6,dichlorophénol-indophénol de sodium (Poudre Sigma D-1878; FW 290,1, corrigé 326,1)	Peser 72.5 mg de la poudre de DCPIP, diluer avec 50 mL d'eau distillée. Marquer la date car le mélange ne se garde que 1 mois.	Poudre dans le dessiccateur à température ambiante
50 mM K phosphate pH 7,0 (potassium dihydrogéno-phosphate (K_1) Prolabo 33611-265 FW 136,09; Di-potassium hydrogéno-phosphate (k_2) Prolabo 33612-268 FW 174,18)	Peser 3,4 g de poudre K_1 et diluer dans 500 mL d'eau distillée; peser 4,35 g de poudre K_2 et diluer dans 500 mL d'eau distillée; Mélanger les solutions sous contrôle du pH en ajoutant la solution acide (K_1) dans la solution alcaline (K_2) jusqu'à obtention du pH 7,0. Aliquotes de 50 mL.	Poudre à température ambiante
500 mM K phosphate pH 7,5 (potassium dihydrogéno-phosphate (K_1) Prolabo 33611-265 FW 136,09; Di-potassium hydrogéno-phosphate (k_2) Prolabo 33612-268 FW 174,18)	Peser 34 g de poudre K_1 et diluer dans 500 mL d'eau distillée; peser 43,5 g de poudre K_2 et diluer dans 500 mL d'eau distillée Mélanger les solutions sous contrôle du pH en ajoutant la solution acide (K_1) dans la solution alcaline (K_2) jusqu'à obtention du pH 7,0. Aliquotes de 50 mL.	Poudre à température ambiante
1 M Tris HCl pH 8,1 (Prolabo 28811-295 ; FW 121,14)	Peser 6,06 g de poudre de Tris base, diluer dans 30 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 8,1 avec de l'acide chlorhydrique 5N puis 1N, compléter le volume à 50 mL avec de l'eau distillée	Poudre à température ambiante
100 mM Tris HCl pH 8,1 (Prolabo 28811-295 ; FW 121,14)	Peser 6,06 g de poudre de Tris base, diluer dans 400 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 8,1 avec de l'acide chlorhydrique 5N puis 1N, compléter le volume à 500 mL avec de l'eau distillée	Poudre à température ambiante
10% Triton-X100 (solution Sigma X-100)	Diluer 5 mL de Triton-X100 avec 45 ml d'eau distillée	Solution 100% à température ambiante
Tampon "Mannitol" = pH 7.2 225 mM mannitol 75 mM saccharose 10 mM Tris HCl 0,1 mM EDTA (Mannitol Sigma M-9546; FW 182,2 - Saccharose Fluka 84105; FW 342,3 - EDTA Sigma E-7889; solution 0,5 M)	Peser 2,05 g de mannitol , 1,28 g de saccharose, 60,6 mg de Tris, ajouter 10 µL de solution0,5 M EDTA, diluer avec 40 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 et compléter le volume à 50 mL avec de l'eau distillée.	Poudres de mannitol, de saccharose, de Tris et solution d'EDTA à température ambiante.

Dosage du complexe I (NADH ubiquinone oxydo-réductase)

Principe :

- Le complexe I de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du NADH en NAD+, son activité sera donc évaluée par la disparition du NADH qui absorbe à 340 nm. L'accepteur naturel des électrons du complexe I est le coenzyme Q_{10} ou ubiquinone. Cette molécule très hydrophobe est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, beaucoup plus hydrophile.
- L'activité parallèle, non respiratoire, d'oxydation du NADH due à l'activité cytochrome b_5 oxydo-réductase, est insensible à la roténone, inhibiteur spécifique du complexe I. Elle est mesurée par un dosage parallèle en présence de roténone.
- L'activité spécifique du complexe I est donc la partie sensible à la roténone de l'activité NADH oxydase totale. Elle est mesurée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à la roténone.

En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 12 dosages.
- Composition du milieu de réaction :
  100 µM NADH
  100 µM décylubiquinone
  50 mM K Phosphate pH 7,5
  3,75 mg/mL d'albumine bovine
  Tissu : 40 µg de protéines (surnageant post-nucléaire de foie ou muscle) ou 4 µg de mitochondries isolées
  Inhibition par 12,5 µM roténone.
- Préparation du milieu de réaction :
  1) Dans un tube de 50 mL, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages soit 14 cuves :

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
500 mM K Phosphate pH 7,5	1540 µL	220 µL
50 mg/mL BSA	1155 µL	165 µL
25 mM décylubiquinone	63 µL	9 µL
H_2O	11564 µL	1652 µL

  2) Dans une cuvette de 2 mL, mettre **2045 µL du milieu de réaction et ajouter 44 µL d'homogénat tissulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/mL) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0,2 mg/mL soit 1/200). Mélanger.
  3) Transférer **950 µL** du mélange dans chacune de 2 cuves de 1 ml qui seront analysées en parallèle.
  4) Ajouter **5 µL de 2,5 mM roténone dans l'une des cuves de 1 mL**, mélanger.
- Réaction :
  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 340 nm
  Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Incuber les cuves **à 37°C, durant 5 min,** dans le spectrophotomètre thermostaté
  3) Démarrer la réaction avec **50 µL de 2 mM NADH gardé à température ambiante**.
  4) Lecture toutes les 15 secondes durant 3 minutes,
  Les 2 cuvettes correspondant au même échantillon sont lues en même temps. On peut lire 4 cuvettes en même temps. Si la décroissance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.
- Calcul :
  1) L'activité spécifique est calculée et rendue en nanomoles/min/mg de protéines.
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le NADH est **ε = 6,2**
  3) Le facteur de correction est donc 4032,3 pour 40 µg de protéines dans l'essai (homogénat) et 40323 pour 4 µg de protéines dans l'essai (mitochondries isolées)

Dosage du complexe II (succinate ubiquinone oxydo-réductase)

Principe :

- Le complexe II de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du succinate dont il transfère les électrons au coenzyme Q_{10} ou ubiquinone. Cette molécule très hydrophobe est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, beaucoup plus hydrophile. L'activité est mesurée en suivant la réduction du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé.
- La ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire une réaction spontanée de transfert d'électrons au DCPIP. La spécificité de la réaction peut être vérifiée par son Inhibition par le malonate 10 mM, inhibiteur spécifique du complexe II. Cette vérification n'est pas obligatoire en routine diagnostique du fait de la grande spécificité de la réaction (vérifiée au dessus de 90% sur l'homogénat de muscle et de foie).

En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 6 dosages.
- Composition du milieu de réaction :
  25 mM K Phosphate pH 7.5
  20 mM succinate
  100 µM décylubiquinone
  50 µM DCPIP
  1 mM KCN
  100 µM ATP
  2 mg/mL albumine bovine
  Tissu : 40 µg de protéines (surnageant post-nucléaire ou suspension cellulaire) ou 4 µg de mitochondries isolées
- Préparation du milieu de réaction :
  1) Dans un tube de 15 mL, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages:

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
500 mM K Phosphate pH 7,5	350 µL	50 µL
50 mg/mL BSA	280 µL	40 µL
200 mM succinate	700 µL	100 µL
5 mM DCPIP	70 µL	10 µL
10 mM KCN	700 µL	100 µL
10 mM ATP	70 µL	10 µL
H_2O	4662 µL	666 µL

  2) Dans une cuvette de 1 mL, mettre **976 µL du milieu de réaction et ajouter 20 µL d'homogénat tissulaire ou de suspension cellulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/mL) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0,2 mg/ml soit au 1/200). Mélanger.
- Réaction :
  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 600 nm. Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Incuber les cuves **à 37°C, durant 5 min,** dans le spectrophotomètre thermostaté
  3) Lire la ligne de base pendant 3 minutes à 37°C
  4) Déclencher la réaction **par 4 µL de 25 mM décylubiquinone**
  5) Lecture toutes les 15 secondes durant 3 minutes ; si la décroissance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.
- Calcul :
  1) L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité de base en nanomoles/min/mg de protéines.
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le DCPIP est **ε = 19,1**
  3) Le facteur de correction est donc 1308,9 pour 40 µg de protéines et 13089 pour 4 µg de protéines dans l'essai.

Dosage du complexe III (ubiquinol cytochrome c oxydo-réductase)

Principe :

- Le complexe III de la chaîne respiratoire permet l'oxydation de l'ubiquinol (forme réduite de l' ubiquinone ou coenzyme Q_{10}) dont il transfère les électrons au cytochrome c dont la réduction est suivie par l'augmentation d'absorbance à 550 nm.
- Il existe des activités parallèles, non respiratoires, d'oxydation de l'ubiquinol. L'antimycine A est un des inhibiteurs spécifiques du complexe III. L'activité spécifique du complexe III est donc calculée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à l'antimycine A qui est mesurée par un dosage parallèle en présence d'antimycine A.

En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 12 dosages.
- Composition du milieu de réaction :

  200 µM décylubiquinol
  50 µM cytochrome c
  100 mM K Phosphate pH 7,5
  250 µM EDTA
  Tissu : 30 µg de protéines (surnageant post-nucléaire (foie ou muscle) ou suspension cellulaire) et 0,75 µg de mitochondries isolées
  Inhibition par 12,5 µg/mL d'antimycine A

- Préparation du milieu de réaction :

  1) Dans un tube de 50 mL, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages soit 14 cuves :

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
500 mM K Phosphate pH 7,5	3080 µL	440 µL
1 mM cytochrome c	770 µL	110 µL
50 mM EDTA	77 µL	11 µL
H_2O	11116 µL	1588 µL

  2) Dans une cuvette de 2 mL, mettre **2149 µL du milieu de réaction et ajouter 33 µL d'homogénat tissulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/mL) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0,05 mg/mL soit 1/800). Mélanger.

  3) Transférer **992 µL** du mélange dans chacune de 2 cuves de 1 ml qui seront analysées en parallèle.

  4) Ajouter **5 µL de 2,5 mg/mL antimycine A dans l'une des cuves de 1 mL**, mélanger.

- Réaction :

  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 550 nm
  Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Incuber les cuves **à 37°C, durant 5 min,** dans le spectrophotomètre thermostaté
  3) Démarrer la réaction avec **8 µL de 25 mM décylubiquinol gardé à 37°C**.
  4) Lecture toutes les 10 secondes durant 3 minutes,
  Les 2 cuvettes correspondant au même échantillon sont lues en même temps.
  On peut lire 4 cuvettes en même temps.

  Si la croissance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu. La linéarité obtenue est médiocre avec les mitochondries isolées pour lesquelles l'activité est mesurée pendant la première minute.

- Calcul :

  1) L'activité spécifique est calculée et rendue en nanomoles/min/mg de protéines.
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le cytochrome c est **ε = 18,5**
  3) Le facteur de correction est donc 1801,8 pour 30 µg de protéines dans l'essai (homogénat) et 72072 pour 0,75 µg de protéines dans l'essai (mitochondries isolées).

Dosage du complexe IV (cytochrome c oxydase)

Principe :

- Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c, son activité sera donc évaluée par la disparition du cytochrome c réduit qui absorbe à 550 nm. L'accepteur naturel des électrons du complexe IV est l'oxygène.

En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'un même série
- Composition du milieu de réaction :
  50 mM K phosphate pH 7,0 (25 mM pour les fibroblastes)
  100 µM cytochrome c réduit (50 µM pour les fibroblastes)
  Tissu: 40 µg protéines (homogénat post-nucléaire ou suspension cellulaire) ou 1 µg de mitochondries purifiées
- Préparation des solutions de référence de cytochrome c réduit, de cytochrome c oxydé et de la solution qui sera utilisée pour les dosages :
  1) Préparer 12 à 13 mL de solution de 100 µM cytochrome c dans 50 mM K phosphate pH 7,0
  2) Préparer la « **Solution 100% oxydée** » en transférant 1 mL de la solution initiale de 100 µM cytochrome c dans une cuvette de 1 mL et en l'oxydant avec quelques grains de **ferricyanure de potassium** (la solution devient orange sombre)
  3) Préparer la « **Solution 100% réduite** » en transférant 1 mL de la solution initiale de 100 µM cytochrome c dans une cuvette de 1 mL et en la réduisant avec quelques grains de **dithionite de sodium** (bisulfite) (la solution devient rose saumon).
  4) Dans le spectrophotomètre à 37°C, longueur d'onde 550 nm, faire le blanc sur l'air puis mesurer l'absorbance de la « Solution 100% oxydée » qui doit être autour de 0,7 pour la solution à 100 µM
  5) Refaire le blanc sur la « Solution 100% oxydée » pour avoir une absorbance nulle pour une réduction nulle
  6) Mesurer l'absorbance de la « Solution 100% réduite », la noter,

  Réduire progressivement la solution initiale de 100 µM de cytochrome c avec des aliquotes de la « Solution 100% réduite » (on commence par 50-100 µL). le degré de réduction est suivi par la mesure de l'absorbance à 550 nm. On doit obtenir une absorbance entre 90 et 95% de l'absorbance mesurée avec la solution « 100% réduite ».
- Réaction :
  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 550 nm. Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Préparer des cuvettes contenant 980 µL de la solution de cytochrome c réduit.
  3) Incuber les cuvettes 5 minutes à 37°C dans le spectrophotomètre thermostaté.
  4) Déclencher la réaction par l'ajout de **20 µL d'homogénat tissulaire ou de suspension cellulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/mL) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0,05 mg/ml soit 1/800). Mélanger.
  5) Lecture toutes les 10 secondes durant 3 minutes. On peut lire 2 cuvettes en même temps. Si la décroissance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.
- Calcul :
  1) L'activité spécifique est calculée et rendue en nanomoles/min/mg de protéines.
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le cytochrome c est **ε = 18,5**
  3) Le facteur de correction est donc 1351,4 pour 40 µg de protéines dans l'essai (homogénat) et 54054 pour 1 µg de protéines dans l'essai (mitochondries isolées, 20 µL au 1/800).

Dosage des complexes I + III (NADH cytochrome C oxydo-réductase)

Principe :
- Les complexes I et III de la chaîne respiratoire permettent l'oxydation du NADH en NAD+, et transfèrent les électrons au cytochrome c. Cette activité est évaluée par l'augmentation de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm.
- L'activité parallèle, non respiratoire, d'oxydation du NADH est insensible à la roténone, inhibiteur spécifique du complexe I. Elle est mesurée par un dosage parallèle en présence de roténone. La partie spécifique, respiratoire, de l'activité NADH cytochrome c oxydo-réductase est mesurée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à la roténone.
- L'oxydation du cytochrome c réduit par le complexe IV est inhibée par le cyanure de potassium (KCN).

En pratique :
- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 12 dosages.
- Composition du milieu de réaction :
  200 µM NADH
  100 µM cytochrome c
  50 mM K Phosphate pH 7,5
  1,0 mg/ml d'albumine bovine
  1 mM KCN
  Tissu : 40 µg de protéines (surnageant post-nucléaire (foie ou muscle) ou suspension cellulaire) ou 4 µg de mitochondries isolées
  Inhibition par 12,5 µM roténone.
- Préparation du milieu de réaction :
  1) Dans un tube de 50 ml, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages soit 14 cuves :

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
500 mM K Phosphate pH 7,5	1540 µL	220 µL
50 mg/ml BSA	308 µL	44 µL
10 mM KCN	1540 µL	220 µL
1 mM cytochrome c	1540 µL	220 µL
H_2O	8624 µL	1232 µL

  2) Dans une cuvette de 2 ml, mettre **1936 µL du milieu de réaction et ajouter 44 µL d'homogénat tissulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/ml) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0.2 mg/mL soit 1/200). Mélanger.
  3) Transférer **900 µL** du mélange dans chacune de 2 cuves de 1 ml qui seront analysées en parallèle.
  4) Ajouter **5 µl de 2,5 mM roténone dans l'une des cuves de 1 mL**, mélanger.
- Réaction :
  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 550 nm. Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Incuber les cuves **à 37°C, durant 5 min,** dans le spectrophotomètre thermostaté
  3) Démarrer la réaction avec **100 µl de 2 mM NADH gardé à température ambiante**.
  4) Lecture toutes les 15 secondes durant 3 minutes,
  Les 2 cuvettes correspondant au même échantillon sont lues en même temps. On peut lire 4 cuvettes en même temps. Si la croissance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.
- Calcul :
  1) L'activité spécifique est calculée et rendue en nanomoles/min/mg de protéines.
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le cytochrome c est **ε = 18,5**
  3) Le facteur de correction est donc 1351,4 pour 40 µg de protéines dans l'essai (homogénat) et 13514 pour 4 µg de protéines dans l'essai (mitochondries isolées).

Dosage de l'activité II + III (succinate cytochrome c oxydo-réductase)

Principe :

- Les complexes II et III de la chaîne respiratoire permettent l'oxydation du succinate en fumarate et transfèrent les électrons au cytochrome c. Cette activité est évaluée par l'augmentation de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm.
- L'oxydation du cytochrome c réduit par le complexe IV est inhibée par le cyanure de potassium (KCN).

En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 6 dosages.
- Composition du milieu de réaction :
  20 mM K Phosphate pH 7.5
  20 mM succinate
  100 µM cytochrome c
  1 mM KCN
  100 µM ATP
  2 mg/ml albumine bovine
  Tissu : 40 µg de protéines (surnageant post-nucléaire ou suspension cellulaire) ou 4 µg de mitochondries isolées
- Préparation du milieu de réaction :
  1) Dans un tube de 15 ml, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages:

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
500 mM K Phosphate pH 7,5	280 µL	40 µL
50 mg/ml BSA	280 µL	40 µL
200 mM succinate	700 µL	100 µL
10 mM KCN	700 µL	100 µL
10 mM ATP	70 µL	10 µL
H_2O	4662 µL	590 µL

  2) Dans une cuvette de 1 ml, mettre **880 µL du milieu de réaction et ajouter 20 µL d'homogénat tissulaire ou de suspension cellulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/ml) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0,2 mg/ml soit 1/200). Mélanger.
- Réaction :
  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 550 nm
     Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Incuber les cuves **à 37°C, durant 5 min,** dans le spectrophotomètre thermostaté
  3) Déclencher la réaction **par 100 µL de 1 mM cytochrome c** gardé à température ambiante. On peut lire 6 cuves en même temps.
  4) Lecture toutes les 20 secondes durant 3 minutes ; si l'augmentation d'absorbance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.
- Calcul :
  1) L'activité spécifique est calculée en nanomoles/min/mg de protéines
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le cytochrome c est **ε = 18,5**
  3) Le facteur de correction est donc 1351,4 pour 40 µg de protéines dans l'essai et 13514 pour 4 µg de protéines dans l'essai (mitochondries isolées)

Dosage de la Citrate synthase

Principe :

- La citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA. Cette activité est employée pour évaluer la quantité de mitochondries dans les tissus. Le CoA réduit (CoA-SH) formé lors de la réaction réagit avec le 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) pour donner du TNB qui absorbe spécifiquement à 412 nm. L'activité de la citrate synthase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm.
- La ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire une réaction spontanée de transfert d'électrons.

En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 6 dosages.
- Composition du milieu de réaction :
  100 µM DTNB
  100 mM Tris HCl pH 8,1
  300 µM acétyl CoA
  500 µM oxaloacétate
  0,1 % Triton X100
  Tissu : 40 µg de protéines (surnageant post-nucléaire ou suspension cellulaire) ou 4 µg de mitochondries purifiées
- Préparation du milieu de réaction :
  1) Dans un tube de 15 mL, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages:

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
5 mM DTNB	140 µL	20 µL
10 mM acétylCoA	210 µL	30 µL
10% Triton X100	70 µL	10 µL
1 M Tris HCl pH 8,1	665 µL	95 µL
H_2O	5425 µL	775 µL

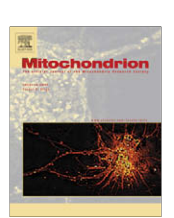
  2) Dans une cuvette de 1 mL, mettre **930 µL du milieu de réaction et ajouter 20 µL d'homogénat tissulaire ou de suspension cellulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/mL) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à0,2 mg/ml soit 1/200). Mélanger.
- Réaction :
  1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 412 nm. Calibration initiale de la lecture sur l'air.
  2) Incuber les cuves **à 37°C, durant 5 min,** dans le spectrophotomètre thermostaté
  3) Lire la ligne de base pendant 4 minutes à 37°C. On peut lire 6 cuves en même temps.
  4) Déclencher la réaction **par 50 µL de 10 mM acide oxaloacétique dans 100 mM Tris HCl pH 8,1.**
  5) Lecture toutes les 20 secondes durant 4 minutes ; si l'augmentation de l'absorbance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.
- Calcul :
  1) L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité de base en nanomoles/min/mg de protéines.
  2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le TNB est **ε = 13,6**
  3) Le facteur de correction est donc 1838,2 pour 40 µg de protéines et 18382 pour 4 µg de protéines dans l'essai.

Mitochondrion 9 (2009) 331–339

Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito



Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis

F. Medja [a], S. Allouche [b], P. Frachon [a], C. Jardel [a,c,d], M. Malgat [e], B. Mousson de Camaret [f], A. Slama [g], J. Lunardi [h], J.P. Mazat [e], A. Lombès [a,c,d,*]

[a] INSERM, U975, Paris F-75013, France
[b] Laboratoire de Biochimie, Centre hospitalier et universitaire de Caen, F-14033 Caen cedex, France
[c] Université Pierre et Marie Curie-Paris6 UPMC-Paris6, Paris F-75005, France
[d] AP/HP, Laboratoire de Biochimie métabolique, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris F-75651, France
[e] INSERM, U688, Université Bordeaux II, F-33076 Bordeaux cedex, France
[f] Centre de Biologie et de Pathologie Est, Service des Maladies Héréditaires du Métabolisme, F-69677 Bron, France
[g] AP-HP, Laboratoire de Biochimie, Hôpital de Bicêtre, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France
[h] Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Centre hospitalier et universitaire, F-38043 Grenoble cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 November 2008
Received in revised form 30 April 2009
Accepted 4 May 2009
Available online 9 May 2009

Keywords:
Diagnostic test assessment
Mitochondrial disorders
Respiratory chain complexes

ABSTRACT

Diversity of respiratory chain spectrophotometric assays may lead to difficult comparison of results between centers. The French network of mitochondrial diseases diagnostic centers undertook comparison of the results obtained with different protocols in the French diagnostic centers. The diversity of protocols was shown to have striking consequences, which prompted the network to undertake standardization and optimization of the protocols with respect to clinical diagnosis, i.e. high velocity while maintaining linear kinetics relative to time and enzyme concentration. Assays were set up on animal tissues and verified on control human muscle and fibroblasts.

Influence of homogenization buffer and narrow range of optimal concentration of phosphate, substrate and tissue were shown. Experimental data and proposed protocols have been posted on a free access website. Their subsequent use in several diagnostic centers has improved consistency for all assays.

1. Introduction

1.1. The need for standardized enzymatic investigations of patients with mitochondrial diseases

Mitochondrial diseases, defined as the diseases that are due to an inherited alteration of the oxidative phosphorylation pathway, are highly complex disorders with diverse clinical presentation with respect to age of onset, symptoms, and rate of progression (DiMauro and Hirano, 2005). Their diagnosis relies upon a series of metabolic, morphological, and biochemical investigations, the results of which are disputable in terms of specificity (they may be altered in non-mitochondrial diseases) as well as sensitivity (they may be normal in authentic mitochondrial disorders) (Taylor et al., 2004; Trijbels et al., 1993). Identifying the genetic cause therefore represents the ultimate proof of the diagnosis but this is an extraordinary challenge for the medical community because of the high number of candidate genes, located either in mitochondrial DNA or in the nuclear genome. Recognition of homogeneous groups of patients would significantly facilitate the search for the cause of mitochondrial diseases.

Abbreviations: AFM, Association Française contre les Myopathies; III, respiratory complex III, i.e. antimycin-sensitive ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase (EC 1.10.2.2); Total III, ubiquinol-cytochrome *c* reductase in the absence of antimycin; BSA, bovine serum albumin; IV, respiratory complex IV, i.e. cytochrome *c* oxidase (EC 1.9.3.1); I, respiratory complex I, i.e. rotenone-sensitive NADH ubiquinone oxidoreductase (EC 1.6.5.3); SDH, succinate dehydrogenase (proximal part of respiratory complex II); II, respiratory complex II, i.e. succinate ubiquinone oxidoreductase activity (EC 1.3.5.1); I + III, rotenone-sensitive NADH: cytochrome *c* oxidoreductase; II + III, succinate cytochrome *c* oxidoreductase; CS, citrate synthase; dUb, decylubiquinone; succ, succinate; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; dUb-H_2, decylubiquinol; cyt *c*, cytochrome *c*; red cyt *c*, reduced cytochrome *c*; ACoA, acetylCoenzyme A; OA, oxaloacetate; DTNB, 5,5′ dithiobis 2 nitrobenzoic acid; I/CS, II/CS, III/CS, IV/CS and IV/I, are the ratios of the corresponding activities.

* Corresponding author. Present address: Inserm U975, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France. Tel.: +33 1 42 16 57 17; fax: +33 1 42 16 57 00.

E-mail addresses: l.medja@aliceadsl.fr (F. Medja), allouche-s@chu-caen.fr (S. Allouche), paule.frachon@free.fr (P. Frachon), claude.jardel@psl.aphp.fr (C. Jardel), monique.malgat@orange.fr (M. Malgat), benedicte.mousson-de-camaret@chu-lyon.fr (B.M.de Camaret), abdel.slama@bct.aphp.fr (A. Slama), jlunardi@chu-grenoble.fr (J. Lunardi), jp.mazat@u-bordeaux2.fr (J.P. Mazat), a.lombes@institut-myologie.org (A. Lombès).

1567-7249/$ - see front matter © 2009 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mito.2009.05.001

However the nature, number and protocol of investigations applied to mitochondrial disorders may greatly vary between different diagnostic centers, thus preventing direct comparison of patients results obtained in different centers. Previous work has been done to standardize protocols for metabolic (Touati et al., 1997) and morphological (Romero et al., 1996) analyses of mitochondrial patients. It has not been done for the assays of mitochondrial activities for which exist very diverse protocols (Bénit et al., 2006; Birch-Machin et al., 1989; Chretien et al., 2004; Estabrook and Pullman, 1967; Janssen et al., 2007; Kirby et al., 2007; Rustin et al., 1994; Trounce et al., 1996; Zheng et al., 1990) that have been shown to induce large variation of experimental results (Gellerich et al., 2004).

1.2. Standardization of spectrophotometric assays within the frame of the French network of mitochondrial diseases diagnostic centers

In 2000 a network regrouping all the French laboratories involved in the biochemical and genetic diagnosis of human mitochondrial diseases was initiated to improve identification of the causes of mitochondrial diseases, to establish a national register of patients and to set up inter-laboratory quality controls for the diverse diagnostic investigations. The first analyses to be proposed for evaluation were the spectrophotometric assays of respiratory chain activities. The reasons for that choice was that these assays were reputed very diverse and were used in all the centers, either in isolation or in addition to other biochemical assays such as polarography or ATP measurements. To simplify the matter, the assays of respiratory complexes I, II, III and IV as well as citrate synthase activity were first evaluated because they can be applied on homogenates as well as on mitochondrial fractions.

The consequences of the diversity of the protocols on the range of experimental results was initially analyzed; it was shown to be striking as previously reported (Gellerich et al., 2004; Kirby et al., 2007). That observation prompted members of the network to try and standardize the assays protocols. To spare human samples, animal tissues (beef heart mitochondria and mouse quadriceps homogenate) were first assayed. Experimental conditions were then verified in human control muscle homogenates and sonicated human fibroblasts. Even though the biochemistry of the respiratory chain poses intrinsic difficulties, mainly due to the fact that respiratory complexes and part of the substrates/products are located in a membrane environment, reliable protocols could be developed. They are progressively implemented in the French diagnostic centers. Three centers have now used them for over a year and have gathered enough results from control samples to allow analyzing reproducibility and reliability. In this paper we summarize our results from testing the previous protocols to defining optimal conditions for measurement of each respiratory chain complex. Finally we discuss the compromises that were required to develop protocols suitable for use in clinical diagnostic laboratories.

2. Material and methods

2.1. Preliminary discussion

All diagnostic centers within the French network contributed to preliminary discussions about the diverse protocols of sample preparation and assays in use. The persons involved at the time in the discussion were from the diagnostic centers that are located in Angers (Dr. Olivier Douay, Dr. Gilles Simard, CHU d'Angers), Bordeaux (Dr. Thierry Letellier, Monique Malgat, Pr. Jean Pierre Mazat, Université Bordeaux 2), Caen (Dr. Stéphane Allouche, CHU de la Côte de Nacre), Grenoble (Pr. Joël Lunardi, CHU de Grenoble), Lille (Pr. Bernard Sablonnière, Hôpital Roger Salengro), Lyon (Dr. Bénédicte Mousson de Camaret, Hospices Civils de Lyon and Dr. Catherine Godinot, Claude Bernard University, Lyon), Marseille (Dr. Marie France Montfort, CHU La Timone), and Paris (Dr. Michèle Brivet, Dr. Abdel Slama, CHU Bicêtre; Dr. Agnès Rötig, Dr. Pierre Rustin, CHU Necker-Enfants malades; Paule Frachon, Dr. Claude Jardel, Dr. Anne Lombès, CHU Pitié-Salpêtrière). The initial discussion led to the decision to assay the respiratory chain complexes activities at 37 °C in order to allow comparison with polarography. Agreement was also reached on the parameters that required experimental validation so that optimal conditions for a diagnostic assay could be established i.e. highest maximal velocity (to improve sensitivity in order to better detect partial enzymatic failure) as well as linear kinetics with time (to avoid common miscalculations of initial velocity) and with amount of protein (to correctly assess the actual activity).

2.2. Material

To spare human samples, it was decided to initially work on animal tissues. Isolated beef heart mitochondria were chosen to provide large stock of homogeneous mitochondrial fractions that were needed for initial evaluations. They were prepared using a method adapted from (Smith, 1967). All operations were conducted at a temperature of 6 °C. Ventricular cardiac muscle obtained from freshly slaughtered animals was homogenized in cold 0.27 M sucrose, 10 mM K_2HPO_4 with pH adjusted at 7.4 by addition of 1 M Tris®–base. Two centrifugations at 4 °C, first of the homogenate for 15 min at 1000*g* then of the resulting supernatant for 30 min at 14,000*g*, gave a first mitochondrial pellet, which was homogenized in 0.27 M sucrose, 2 mM Tris®–HCl, pH 7.4 and submitted to the same two low speed-high speed centrifugations. The final mitochondrial pellet was homogenized at a concentration of 40 mg/mL and the mitochondrial suspension was frozen in liquid nitrogen as small beads of 50 μL volume and stored at −80 °C. Yield usually was 4–6 g of mitochondrial proteins for one heart. Mouse quadriceps was elected as an easily accessible material allowing the analysis of homogenates preparation. It was obtained from normal animals anesthetized with 2% isoflurane inhalation and kept at −80 °C before use. Muscle was homogenized with a glass–glass Potter in 9 vol of homogenization buffer (typically 50 mg of muscle in 450 μL of buffer), and spun down at 650 g during 20 min at 4 °C. The supernatant was kept and the pellet was suspended in 10 vol of homogenization buffer and submitted to the same procedure. Both supernatants were pooled and used for the assays.

Control human muscle and fibroblasts were obtained through the AFM tissue repository bank in accordance to the local ethics committee. Both muscle fragments and skin biopsy were obtained during surgery of patients without neuromuscular disease. Muscle homogenates were prepared in a manner similar to the mouse muscle homogenates. Fibroblasts were cultured in a high glucose medium supplemented with 1 mM pyruvate, 50 μg/mL uridine, and 10% FCS. They were harvested using standard protocols. For the assays, a pellet from a T75 flask, kept at −80 °C, was suspended in 300 μL of homogenization buffer and sonicated during 5 s on ice.

All assays were performed in temperature-controlled single wavelength spectrophotometer with a multi-cuvette sampler.

2.3. Methods

To establish optimal reaction conditions, each parameter was separately assayed, beginning with the conditions proposed during initial discussions. These parameters were assay buffer concentration, pH, substrate(s) concentration, possible inhibitor(s) and adjuvant(s) such as magnesium, bovine serum albumin (BSA), and EDTA. The last parameter verified was the linearity of the assay

with respect to time and protein concentration. Additional tissue preparations were tested only for the assay of respiratory complex I as they were reported to improve the proportion of rotenone sensitive activity (Chretien et al., 1990). They were a supplementary cycle of freezing and/or an osmotic shock performed by incubation of the tissue sample in water at 37 °C during 5 min (weight/volume from 0.05% to 0.00025% depending on the tissue). The nature, preparation and source of all reagents are indicated on the website of the network of French laboratories, which is accessible at http://lbbma.univ-angers.fr/fmdn. Protein concentration was evaluated with the BCA protein assay (Pierce®) or the Lowry method.

3. Results

3.1. The diversity of the protocols resulted in striking differences in mitochondrial activities

Aliquots of a common preparation of isolated beef heart mitochondria were sent to all the French centers that were performing biochemical evaluation of mitochondrial activities. All but one of these centers sent back the mitochondrial activities observed using their usual protocols (Table 1). These protocols varied with respect to temperature, homogenization buffer, and assay medium composition. Evaluation of the protein content was consistent whatever the method used for its measurement. In contrast, as previously reported in similar analyses (Gellerich et al., 2004; Kirby et al., 2007), the differences of respiratory chain assays protocols had striking consequences on the range observed for each individual activity. As an example, the highest activity measured for citrate synthase was 8.6 times the lowest measurement (Table 1). Furthermore the ratios between activities also varied greatly between centers, likely due to the heterogeneous impact of the variability in the protocols used (Table 1). For example the highest ratio of complex III activity to citrate synthase activity was 9.7 times the lowest ratio. This initial evaluation convinced the network members of the need to find and apply standardized protocols in order to allow comparison between centers and to set up a quality control.

3.2. To allow sharing the experimental data underlying the proposed protocols, an open access website was created

Access to the complete set of data was considered important for a widespread standardization procedure. It also might be useful to biologists with specific questions. All experimental results (in French), as well as proposed assay procedures (in French and English), were therefore posted at http://lbbma.univ-angers.fr/fmdn, an open access website of one of the French network centers.

The experimental data represent 28 Excel documents, organized as seven documents: one for each activity (respiratory complex I, II, III, and IV, combined activities I + III and II + III, and citrate synthase) containing each four documents (one for each tissue: beef heart mitochondria, mouse muscle homogenate, human muscle homogenate and human skin fibroblasts suspension). Only the most salient results are commented hereafter.

3.3. Different homogenization buffers resulted in different mitochondrial activities

Three different homogenization buffers were used in the different laboratories of the French network. These buffers have been previously described (Letellier et al., 1992; Lombès et al., 1991; Rustin et al., 1994). They share similar pH and osmolarity but have different composition. Buffer “CCA” is 250 mM sucrose, 40 mM KCl, 2 mM EGTA, 1 mg/mL fatty acid free BSA and 20 mM Tris–HCl pH 7.2 (Rustin et al., 1994). Buffer “MAN” is 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 10 mM Tris–HCl pH 7.4 (Letellier et al., 1992). Buffer “CPT” is 150 mM KCl and 50 mM Tris–HCl pH 7.4 (Lombès et al., 1991).

The composition of the homogenization buffer had an unexpected great impact on the observed activities. For example, respiratory complex IV and citrate synthase activity levels in the beef heart mitochondria were significantly lower when “CCA” buffer was used to dilute the mitochondrial pellet as compared to the activities obtained with the two other buffers (Fig. 1). In contrast, the results obtained using either “MAN” or “CPT” buffer did not significantly differ (Fig. 1). The “MAN” buffer was more generally utilized in the different diagnostic centers than the “CPT” buffer and was therefore chosen for subsequent sample preparations.

3.4. Phosphate concentration of the reaction buffer had significant impact on mitochondrial activities

All French diagnostic centers used phosphate buffer for the assay of respiratory complex activities and Tris buffer for citrate synthase analysis (summarized in Table 2). A consistent pH was used. The influence of pH was systematically re-evaluated (see experimental data at http://lbbma.univ-angers.fr/fmdn). These experiments confirmed that pH has a strong influence on respiratory chain activities and that the pH values in use in all the French diagnostic centers were optimal (values listed in Table 2).

Table 1
Impact on the activities measured by spectrophotometric assays of the mitochondrial respiratory chain of the diversity of protocols used in the different French centers.

Centers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Range
Activities										
I	637	763	2378	860	652	697	960	–	–	637–2378
SDH	552	988	1890	938	531	780	1190	358	–	531–1890
II + III	2244	544	1003	872	790	476	1200	550	792	476–2244
III	–	589	2774	2122	1632	2200	3745	1101	–	589–3745
IV	2917	3337	3930	1636	4530	2010	3070	2200	1003	1003–4530
CS	4517	2036	3697	3248	1997	1560	1330	527	1793	527–4517
Ratios										
I/CS	0.14	0.37	0.64	0.26	0.33	0.45	0.72	–	–	0.14–0.72
SDH/CS	0.12	0.49	0.51	0.29	0.27	0.50	0.89	0.68	–	0.12–0.89
III/CS		0.29	0.75	0.65	0.82	1.41	2.82	2.09	–	0.29–2.82
IV/CS	0.65	1.64	1.06	0.50	2.27	1.29	2.31	4.17	0.56	0.50–4.17
I/II + III	0.28	1.40	2.37	0.99	0.83	1.46	0.80	–	–	0.28–2.37
I/IV	0.22	0.23	0.61	0.53	0.14	0.35	0.31	–	–	0.14–0.61
III/IV	–	0.18	0.71	1.30	0.36	1.09	1.22	0.50	–	0.18–1.30

Activities are expressed as nanomoles per minute and milligram protein. I, rotenone-sensitive NADH ubiquinone oxidoreductase activity; SDH, succinate dehydrogenase activity (proximal part of respiratory complex II); II + III, succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity; III, antimycin-sensitive ubiquinol oxidoreductase activity; IV, cytochrome *c* oxidase activity; CS, citrate synthase activity. Range = range of values between the different centers numbered from 1 to 9. –, data not available.

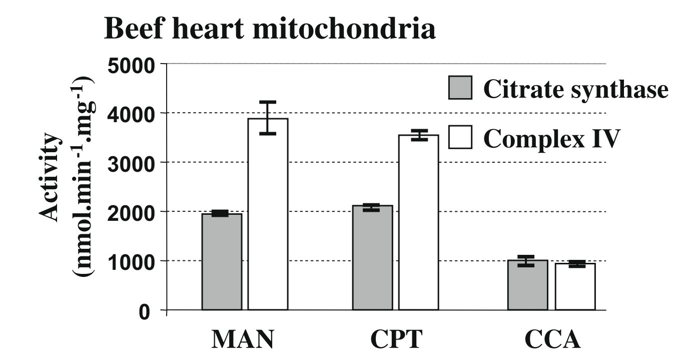


Fig. 1. Influence of the homogenization buffer on mitochondrial activities of beef heart mitochondria. An identical sample of isolated beef heart mitochondria was diluted to its working concentration with three different homogenization buffers: "MAN", "CPT", "CCA" as described in the text. Citrate synthase activity (grey bars) was measured as the rate of appearance of thionitrobenzoic acid followed by the increase of absorbance at 412 nm during 3 min in the presence of 10 μg of isolated mitochondria proteins, 100 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 300 mM acetylCoA, 100 μM DTNB, and 500 μM oxaloacetate. Respiratory complex IV activity (white bars) was measured as the rate of cytochrome *c* oxidation at 550 nm during the first minute of the assay in the presence of 4 μg of isolated mitochondria, 50 mM K phosphate pH 7.0 and 80 μM of reduced cytochrome *c*. The results are shown as the mean values of two assays, the range of which is shown with the error bars; activities are expressed as nanomoles per minute per milligram protein. Dilution of the sample in CCA buffer was associated with a significant decrease of citrate synthase (twofold decrease) and of complex IV (threefold decrease) activities.

In contrast to pH and composition, the phosphate concentration varied between French diagnostic centers. This was shown to have significant influence on all the respiratory chain activities with some differences between tissues (Fig. 2). The sensitivity to phosphate concentration was particularly important for complex IV activity and is shown in Fig. 2. The optimal buffer concentrations chosen for each assay are summarized in Table 2.

3.5. A narrow range of optimal substrate concentration was observed for several respiratory complex activities

Some substrates showed a biphasic effect (activation followed by inhibition) on the respiratory complex activity, which led to a very narrow range for their optimal concentrations. This was particularly true for respiratory complexes III and IV (Fig. 3). It was also observed for the combined I + III and II + III activities (see experimental data at http://lbbma.univ-angers.fr/fmdn).

The activity of respiratory complex III is calculated after measuring ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase activity in the presence and in the absence of antimycin, a specific respiratory complex III inhibitor. The specific complex III activity is obtained by subtracting the antimycin insensitive activity from the total activity. The optimal substrate concentration differed slightly between the two activities, being higher (75–125 μM) for the total activity than for the antimycin-sensitive activity (50–75 μM) (Fig. 3). The concentration of 50 μM cytochrome *c* was chosen to favor the specific antimycin-sensitive activity. The mechanisms underlying the biphasic effect of substrate concentration were probably diverse and their amplitude and position in substrate concentration depended on the tissue. They were particularly striking with murine muscle homogenate (Fig. 3), but less pronounced for other tissues.

In the case of respiratory complex IV, the reaction rate initially followed a hyperbolic relationship to increasing concentrations of reduced cytochrome *c* followed by substrate inhibition (Fig. 3). There again the extent of that behavior depended on the tissue, most probably in connection to the level of enzyme activity. It was much less pronounced in human sonicated fibroblasts than in human muscle (Fig. 3).

3.6. Difficulty to obtain linear kinetics as a function of time

In most cases the high specific activity of the respiratory complex, and possibly its high concentration as compared to the sub-

Table 2
Conditions used in the standardized protocols for spectrophotometric assays of the respiratory chain.

Activity	I	II	III	IV	I + III	II + III	CS
pH	7.5	7.5	7.5	7.0	7.5	7.5	8.0
Phosphate	50	25	100	50 (25 for fibros)	50	20	–
Tris	–	–	–	–	–	–	100
Inhibitor in the assay	±12.5 μM rot	1 mM KCN	1 mM KCN ±12.5 μg/mL antim	–	1 mM KCN ±12.5 μM rot	1 mM KCN	–
Substrates	100 μM NADH 100 μM dUb	20 mM succ. 100 μM dUb 50 μM DCPIP	200 μM dUb-H_2 50 μM cyt *c*	100 μM red cyt *c* (50 for fibroblasts)	200 μM NADH 100 μM cyt *c*	20 mM succ. 100 μM cyt *c*	100 μM DTNB 300 μM ACoA 500 μM OA
Adjuvants	3.75 mg/mL BSA	2 mg/mL BSA 100 μM ATP	250 μM EDTA	–	1 mg/mL BSA	100 μM ATP 2 mg/mL BSA	0.1% Triton-X100
λ (nm)	340	600	550	550	550	550	412
Subtraction	±rot	Baseline	±antim	–	±rot	–	Baseline
Start	NADH	Dub	dUb-H_2	Tissue	NADH	cyt *c*	OA
Reading	3	3	3*	3	3	3	4
Tissue	40 (4)	40 (4)	30 (0.75)	40 (1)	40 (4)	40 (4)	40 (4)
Calculation factor	4032.3 (40,323)	1308.9 (13,089)	1801.8 (72,072)	1351.4 (54,054)	1351.4 (13,514)	1351.4 (13,514)	1838.2 (18,382)

Phosphate: concentration of potassium phosphate expressed as mmol/L; Tris: concentration of Tris buffer expressed as mmol/L; inhibitor: rot = rotenone, KCN = potassium cyanide, antim = antimycin A. Substrates: dUb = decylubiquinone, succ. = succinate, DCPIP = 2,6-dichlorophenolindophenol, dUb-H_2 = decylubiquinol, cyt *c* = cytochrome *c*, red cyt *c* = reduced cytochrome *c*, ACoA = acetylCoenzyme A, OA = oxaloacetate, DTNB = 5,5′ dithiobis 2 nitrobenzoic acid; adjuvants: reagents that are not substrates nor inhibitors: BSA = bovine serum albumin; subtraction: ±rot or ±antim = the activity is measured in two parallel cuvettes, with and without the specified inhibitor and the specific activity is calculated by subtracting the activity measured in the presence of the inhibitor from that measured in its absence, baseline = the specific activity is calculated by subtracting the activity in the absence of substrate from that observed after its addition; λ = wavelength used for the assay, the extinction coefficient ($L\ mmol^{-1}\ cm^{-1}$) used were 6.2 for NADH at 340 nm, 19.1 for DCPIP at 600 nm, 18.5 for cyt *c* at 550 nm, and 13.6 for TNB (thionitrobenzoic acid) at 412 nm; start = compound used to start the reaction; reading = duration of the reaction measurement expressed as minutes, * duration of reading is 1 min for beef heart mitochondria; tissue = amount of tissue used for the assay expressed as micrograms of proteins per assay; calculation factor = factor used to transform the recorded optic density into nanomoles min^{-1}. mg $prot^{-1}$; the numbers between brackets are the amount of tissue or the calculation factor used for isolated beef heart mitochondria.

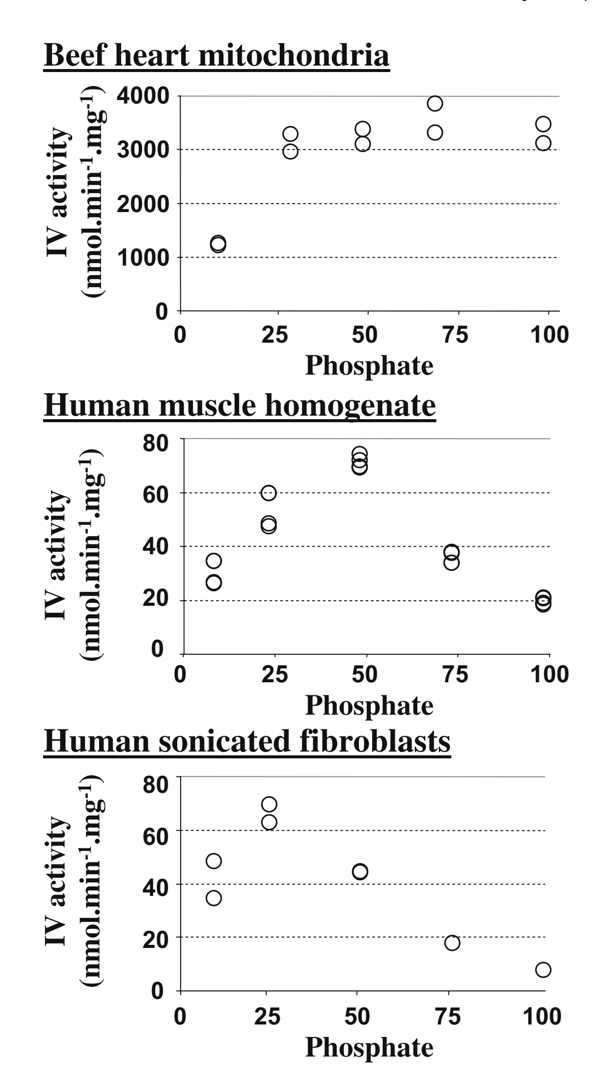


Fig. 2. Influence on complex IV activity of the phosphate concentration used in the assay medium. Complex IV activity was measured as the rate of cytochrome *c* oxidation at 550 nm in the presence of various concentrations of potassium phosphate buffer pH 7.0 (Phosphate), 80 μM of reduced cytochrome *c* (100 μM for muscle), and either 4 μg beef heart mitochondria, 50 μg human muscle homogenate, or 30 μg suspension of sonicated human fibroblasts. Activities were expressed as nanomoles cytochrome *c* oxidized per minute per milligram protein. The sensitivity of respiratory complex IV to phosphate concentration was striking with a sharp maximum of activity in both human muscle and skin fibroblasts. It was less pronounced with isolated beef heart mitochondria.

strate concentration, gave rise to two exponential decays. The relevant measure, which is the initial slope of the first exponential, was difficult to accurately evaluate. This was particularly obvious with isolated beef heart mitochondria in the case of complex III and IV activities (Fig. 4). Quasi-linear kinetics during at least 2 min could however most often be obtained by reducing the amount of protein in the assay. When dealing with the two most active respiratory complexes III and IV in isolated mitochondria, this was only possible with minimal amount of protein (Fig. 4).

3.7. Difficulty to find a range of protein content in the assay with linear relationship with activity

A linear relationship between the amount of protein and the observed activity is ideal to define and then compare specific activities in a diagnostic assay. It was however difficult to obtain with most assays of the respiratory chain complexes. This was particularly the case with the very active beef heart mitochondria for which we have never found conditions that conferred a linear relationship. However, in tissues with less active respiratory chain enzymes (muscle homogenates or fibroblasts), we could define a range of protein content per assay where the relationship between protein content and activity was close to linear. That range was always narrow because it was the result of a compromise between linearity and the need to observe significant activity (Fig. 5).

3.8. Standardized protocols have been applied in several French centers and have given rise to independent sets of control values

During the months following the implementation of the standardized protocols in clinical practice in La Salpêtrière Hospital in Paris, a sample of the large stock beef heart mitochondria was included whenever patient samples were analyzed. Reproducibility of the protocols could therefore be evaluated using the repeated analyses of the same beef heart mitochondria preparation (Table 3). The standard deviation for most assays was close to 10% of the mean activity, thus showing their good reproducibility. This was not true for the assays of complex III activity, either in isolation or as part of a combined activity. The standard deviation, expressed as % of the mean activity, was 57%, 41%, and 26% for the antimycin-sensitive ubiquinol cytochrome *c* activity (complex III), rotenone-sensitive NADH cytochrome *c* oxidoreductase activity (combined I + III) and succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity (combined II + III), respectively. These results show that complex III activity is not reliably measured in isolated beef heart mitochondria.

Since their implementation in clinical practice, standardized protocols have also been applied to biopsies from patients who were later deemed to be free from specific disease. These samples were a posteriori considered as controls. Three different diagnostic centers gathered a sufficient number of these "control samples" to define the range of normal values in muscle, liver and cultured fibroblasts (Table 3). Interestingly the range of normal values appeared similar in the three centers despite the absence of proper inter-laboratory quality control process. Furthermore, in each center, the standard deviation of control complex III or combined I + III and II + III activities was similar to that observed with the other respiratory complexes activities. The unreliability of the evaluation of complex III activity therefore appeared to be essentially confined to the very active beef heart mitochondria. In addition, to validate the new protocols we tried them on a dozen cultured skin fibroblasts with previously identified defects in the respiratory chain complexes. In each case, the previously identified defect was confirmed with the new standardized protocols.

4. Discussion

4.1. Standardized procedures are indispensable for the improvement of the screening and identification of mitochondrial diseases

This paper describes the development of standardized protocols for the most frequently used assays of the respiratory chain activities. It has been an indispensable step in the improvement of the screening and identification of mitochondrial diseases, which is the goal of the network of French diagnostic centers for mitochondrial diseases. Previously, results from the assays of respiratory chain activities were difficult to compare between centers (as shown in Table 1 and in Gellerich et al., 2004; Kirby et al., 2007). Asking a second advice from a different diagnostic center might have therefore led to repeated invasive procedures such as biopsies, repeated analyses, and conflicts between centers, all of which were detrimental for the patient. Standardized assays of respiratory chain activities are mandatory because they allow sharing the results of patients' investigations among different diagnostic centers as well as developing procedures for quality control.

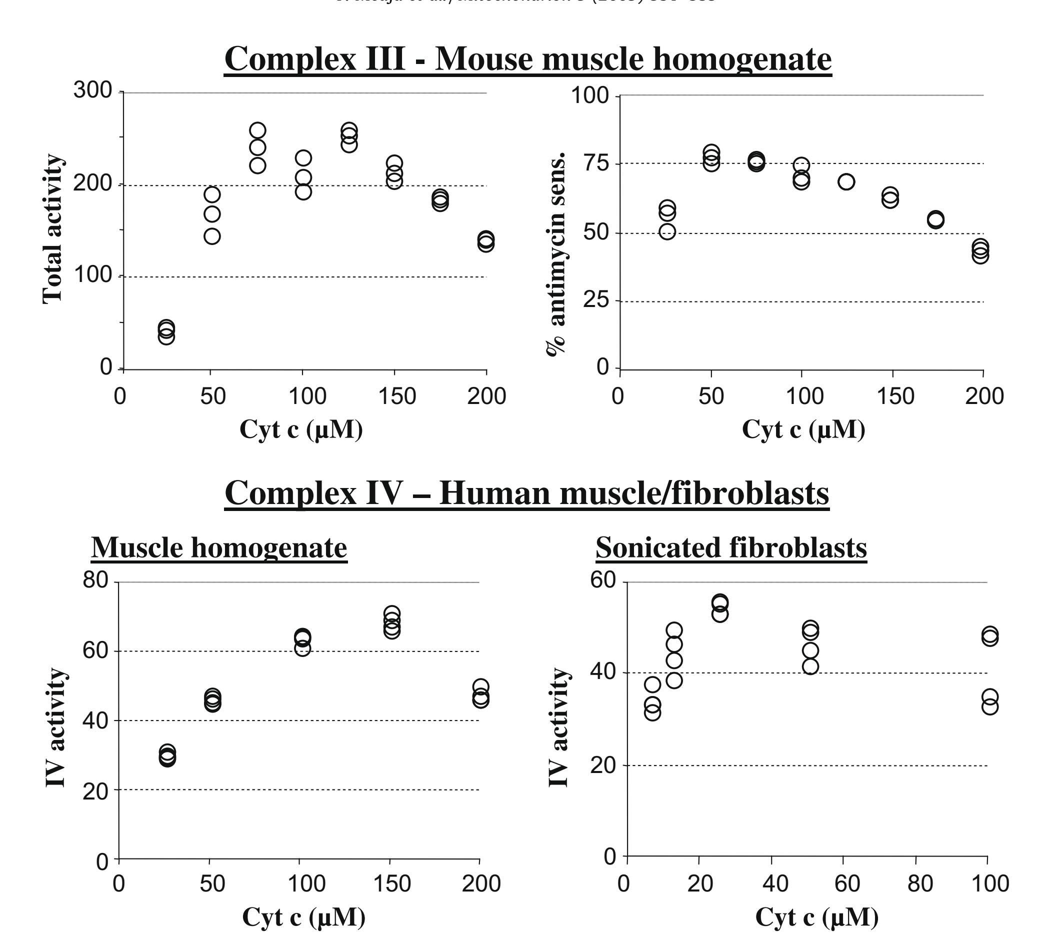


Fig. 3. A narrow range of optimal substrate concentration was observed for several respiratory complex activities. Complex III activity (ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase) in mouse muscle was measured by the rate of cytochrome *c* reduction at 550 nm in the presence of various concentrations of cytochrome *c* (Cyt *c*), 25 µg mouse muscle homogenate, 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.5, 200 µM decylubiquinol, 1 mM KCN, 5 µM rotenone, 0.25 mM EDTA, and 1 mg/mL BSA. Total activity (right panel, total activity) was measured in the absence of antimycin while the specific, antimycin sensitive, complex III activity (left panel, % antimycin sens.) was calculated by subtraction of the activity measured in the presence of 5 µg/mL antimycin from the total activity. It was expressed as the percent of total activity due to the antimycin-sensitive activity. Complex IV activity was measured as the rate of cytochrome *c* oxidation at 550 nm in the presence of various concentrations of reduced cytochrome *c* (Cyt *c*), and either 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 50 µg human muscle homogenate, or 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 30 µg suspension of sonicated human fibroblasts. Activities were expressed as nanomoles cytochrome *c* oxidized per minute and per milligram protein. Cytochrome *c* concentration had a biphasic effect on the respiratory complex III and IV activity thus leading to a narrow range for its optimal concentration.

4.2. The proposed standardized protocols are only part of the enzymatic evaluation of mitochondrial diseases

Our work evaluated the most commonly used protocols but left aside a number of other useful techniques such as the evaluation of oxygen consumption, ATP synthesis, and the preparation of isolated mitochondria. Despite their obvious usefulness, these methods were initially left aside because they were used in only some of the diagnostic centers. Even within the framework of the present standardization, we did not address every aspect of the techniques. In the homogenate preparation for example, we only evaluated the homogenization buffer composition and not procedures of homogenization and centrifugation that were very similar in all French centers. The development of standard protocols for all respiratory chain analyses is a monumental task that we do not intend to address before having proven the feasibility of a quality control program based on the present standardized protocols. Indeed, only a quality control will be able to evaluate if the present standardization is sufficient to obtain comparable data in all centers.

4.3. Clinical practice has been the essential objective of the work

Our work is an additional demonstration of the complexity of the enzymatic behavior of the respiratory chain complexes, which has been extensively shown in numerous excellent previous papers (Bénit et al., 2006; Birch-Machin et al., 1989; Chretien et al., 2004; Estabrook and Pullman, 1967; Kirby et al., 2007; Rustin et al., 1994; Trounce et al., 1996; Zheng et al., 1990). To our knowledge however, such a comprehensive study has never been performed to try and find the simplest and optimal conditions to assess respiratory chain complexes activities for use in clinical practice. It is important to note that, in most instances, the huge initial discrepancy in the recorded activities between different centers (Table 1) could be explained by the influence of only two factors, namely differences in the homogenization buffers and in phosphate concentration in the assays.

The protocols we present in this paper represent compromises between several factors. The wish to have linear kinetics both as a function of time and as a function of enzyme concentration requires the use of low amounts of tissue, but not too low otherwise the results become less reproducible. The search for the simplest protocols (consistent temperatures, buffers common to most assays, addition of the sole inhibitors or adjuvants with significant and reproducible impact on the recorded activity) is essential for a routine diagnostic procedure to be applied in different centers. The final protocols are therefore a compromise between these practical considerations and the optimal conditions identified in research laboratories. In the end, we have been able to find a good compro-

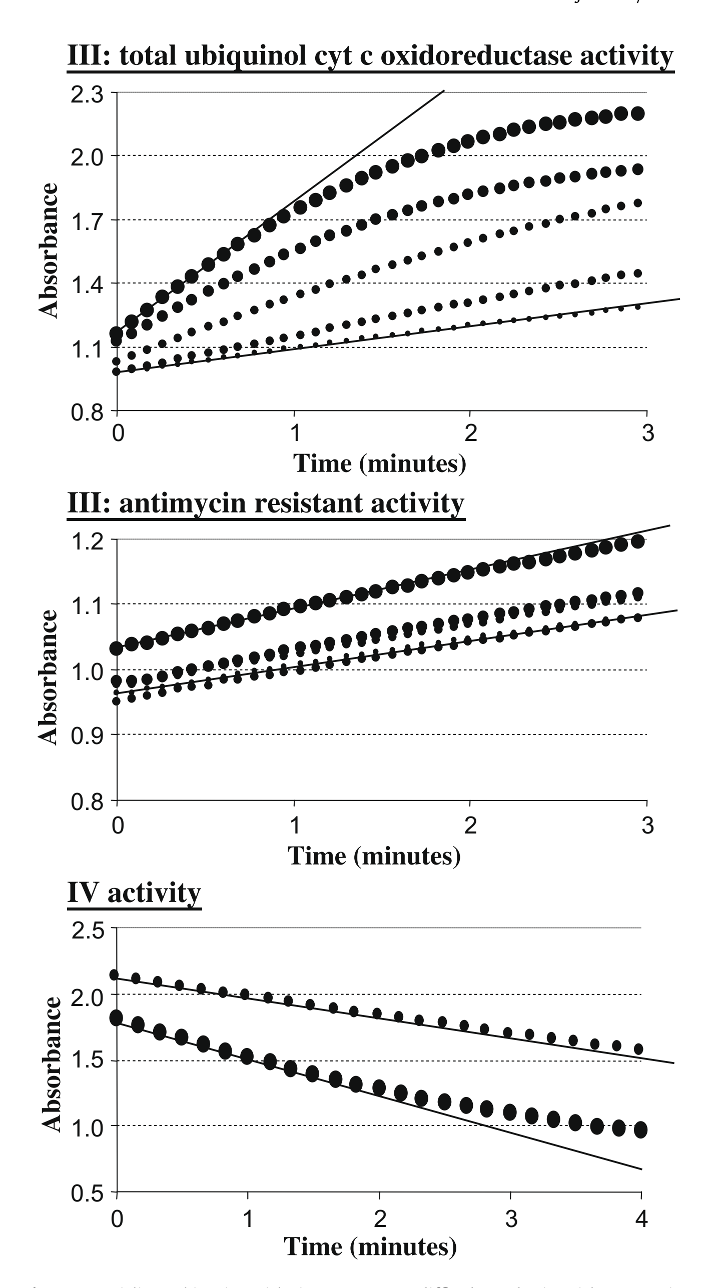


Fig. 4. Quasi-linear kinetics with time were very difficult to obtain with very active tissue. Time course of absorbance values are shown for the assays of Complex III (two upper panels) and complex IV (lower panel). Absorbance values are shown with black circles of increasing size with the increasing amount of mitochondrial protein (1, 2, 4, 6 and 10 μg of beef heart mitochondria for the assays of complex III activity and 1 and 2 μg of beef heart mitochondria for the assay of complex IV activity). Total ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase activity was assayed in the presence of 100 μM cytochrome *c*, 75 mM potassium phosphate buffer pH 7.5, 200 μM decylubiquinol, 1.5 mM KCN, 5 μM rotenone, 0.25 mM EDTA, and 1 mg/mL BSA. Antimycin resistant ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase activity was assayed in the same medium with the addition of 5 μg/mL antimycin. Complex IV activity was measured in the presence of 100 μM reduced cytochrome *c* and 50 mM potassium phosphate pH 7.0. Only the lowest amount of mitochondria gave a decrease of absorbance with pseudo-linear kinetics with time.

mise for all the assays despite the fact that complex III assay remained unsatisfactory with respect to its reproducibility (Table 2). The precise protocols as well as the complete set of experimental data may be found at http://lbbma.univ-angers.fr/fmdn.

Automation of respiratory chain assays have been described in several papers (Kramer et al., 2005; Wibom et al., 2002; Williams et al., 1998). It obviously implied standardization to make sure the conditions were optimal with respect to maximal velocity and linearity with time. Although essentially similar, the published protocols differ from those set up in the present work, for example in the presence of additional reagents (such as EDTA or magnesium), or in the chosen substrate and buffer concentration. These differences may in part be due to the material assayed. Cultured fibroblasts were most often the only tissue assayed in these reports whereas we assayed several tissues and chose the simplest protocol compatible with muscle and fibroblasts analysis. In addition the striking influence of the homogenization buffer composition was shown by the comparison between centers that initiated our work whereas it could not have been taken into account in a single center standardization process. We did not undertake automation of the assays within the French network for the two following reasons. We considered that automation would not bring significant time saving to justify the required supplemental technical verifications as the manual preparation of samples and reagents represents at least half the time spent for the measurement in our present protocol where we simultaneously assay five diagnostic samples and a control. In addition, the inter-assay variability obtained with our standardized protocols is close to that reported with automation procedures.

Our choice of first assaying beef heart mitochondria and mouse muscle aimed at sparing control human muscle and cultured fibroblasts. It however illustrated the variability of respiratory chain activities and their ratios in different tissues (Table 3). In the end, beef heart mitochondria proved a suboptimal control sample for establishing clinical diagnostic tests because this tissue exhibited behaviors due to high enzyme activity levels that were not encountered with human tissue preparations. This was also true for mouse muscle, whose kinetic behavior was often significantly different from that of human muscle, for example in the inhibition of complex III activity by high concentration of cytochrome *c* (see Fig. 3). Most of the difficulties encountered probably stemmed from the high specific activities of beef heart isolated mitochondria and mouse muscle. Their analysis could therefore be considered to act as a safeguard against errors with human specimens exhibiting very high activities.

4.4. The standardization already brought a set of comparable data

The standardized protocols are now progressively applied in six centers in France, which allows for comparison and management of larger sets of results on mitochondrial diseases. Proper quality control process has not yet been established. It will require to produce sufficient quantity of a set of cell lines with diverse enzymatic defect that will be sent to the diagnostic centers in order to serve as blind test samples (Auré et al., 2007). The similarity of the results obtained on control samples in three different centers (Table 3) is a good indication that the network will be able to gather results from numerous control samples analyzed in several diagnostic centers. It will therefore be possible to define normal values for enzyme activities using appropriate large data sets, a situation which is rarely possible in a single center.

Complex III remained a most difficult respiratory complex to assess (Chretien et al., 2004; Krahenbuhl et al., 1994). The difficulties are due to the necessity to prepare reduced ubiquinone, to the high specific activity of the enzyme, and to direct redox interactions between substrates and products of the complex, since auto-oxidized quinone produces both superoxide and hydrogen peroxide, which can directly modify (reduce) cytochrome *c* (Nohl et al., 1998). The extent of the latter phenomenon greatly depends on the quality of cytochrome *c* preparation, even from the same manufacturer. The difficulties in the measurement of isolated complex III activity cannot be overcome by measuring the combined II + III or I + III activities. First a partial defect of complex III can be masked in the combined activities (Taylor et al., 1993, 1994) and second,

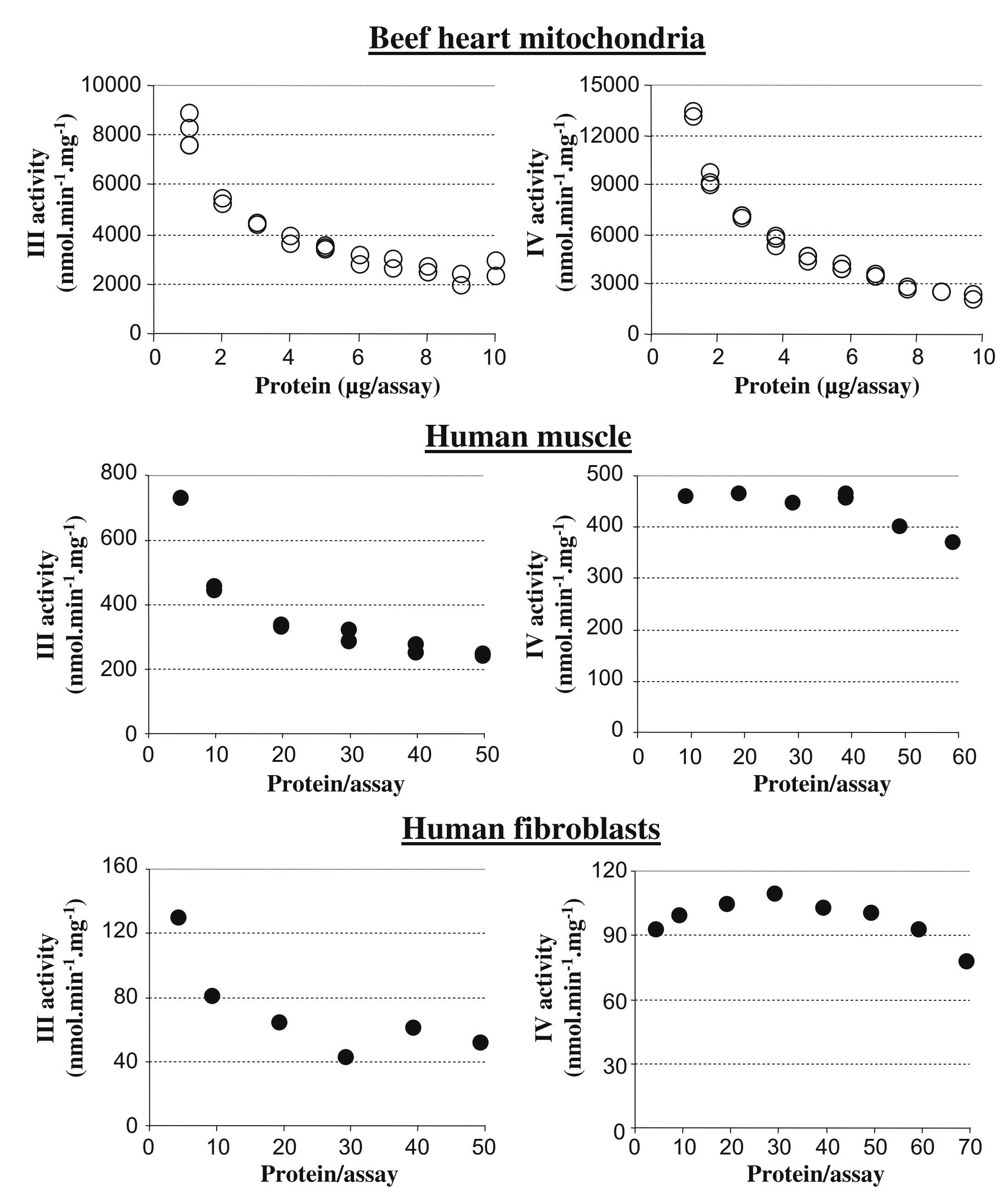


Fig. 5. Narrow range of protein content in the assay showed linear relationship with activity. The influence of the amount of protein in the assay is shown for complex III (III activity = antimycin-sensitive ubiquinol cytochrome *c* activity) and complex IV (cytochrome *c* oxidase activity = IV activity) in beef heart mitochondria (upper panel), human muscle homogenate (middle panel) and sonicated human fibroblasts (lower panel). Activities were expressed as nanomoles per minute and per milligram protein. The rate of cytochrome *c* oxido-reduction was followed at 550 nm. For beef heart mitochondria, III activity was measured in the presence of 100 µM cytochrome *c*, 75 mM potassium phosphate pH 7.5, 200 µM decylubiquinol, 1.5 mM KCN, 5 µM rotenone, 0.25 mM EDTA, and 1 mg/mL BSA, ±5 µg/mL antimycin while IV activity was measured in the presence of 80 µM reduced cytochrome *c* and 50 mM potassium phosphate pH 7.0. For human muscle homogenate, III activity was measured in the presence of 50 µM cytochrome *c*, 100 mM potassium phosphate pH 7.5, 150 µM decylubiquinol, 0.5 mM KCN, and 0.5 mg/mL BSA, ±5 µg/mL antimycin while IV activity was measured in the presence of 100 µM reduced cytochrome *c* and 50 mM potassium phosphate pH 7.0. For sonicated human fibroblasts, III activity was measured in the presence of 50 µM cytochrome *c*, 100 mM potassium phosphate pH 7.5, 200 µM decylubiquinol, 1 mM KCN, and 1 mg/mL BSA, ±5 µg/mL antimycin while IV activity was measured in the presence of 80 µM reduced cytochrome *c* and 25 mM potassium phosphate pH 7.0. Narrow ranges of protein concentration with linear relationship between activity and amount of protein in the assay could be observed in human muscle homogenate and sonicated fibroblasts. In contrast such a linear relationship was never observed in beef heart mitochondria with very high activities of respiratory complex III and IV.

some of the complications that arise when measuring isolated complex III activity are also present in the assay of the combined activities (Kubota et al., 1992).

5. Conclusion

Our work shows that standardization of the spectrophotometric assays of respiratory chain activities is a feasible task. Its completion will require setting up a quality control procedure that is indispensable for fine technical adjustments. Despite its difficulties, standardization of the enzymatic analyses is worth the effort. For the patients, it allows investigations to take place in different centers without the need to repeat the same assays. For the diagnostic centers, it allows comparison and discussion of results as well as the possibility for control accreditation. We are very aware that the present work is only a first step in the process of establish-

Table 3
Results of the standardized protocols in three different diagnostic centers.

	Beef heart mito. (*n* = 58[1])	Human muscle (*n* = 89[1]/39[2]/26[3])	Human liver (*n* = 30[1]/21[2])	Human fibroblasts (*n* = 50[1])
I	1809 ± 178	42 ± 16/42 ± 8/56 ± 31	27 ± 12/36 ± 12	–
II	1813 ± 174	61 ± 22/68 ± 20/79 ± 38	125 ± 59/169 ± 24	27 ± 8
III	888 ± 507	166 ± 72/301 ± 77/252 ± 119	84 ± 35/80 ± 28	55 ± 17
IV	8867 ± 780	184 ± 64/210 ± 42/205 ± 98	69 ± 31/ND	83 ± 15
I + III	426 ± 176	32 ± 16/ND/ND	–	24 ± 7
II + III	1261 ± 324	49 ± 16/48 ± 13/77 ± 46	55 ± 24/37 ± 3*	30 ± 7
CS	2165 ± 215	220 ± 74/278 ± 52/202 ± 102	65 ± 31/80 ± 13	79 ± 18
I/CS	0.84 ± 0.10	0.19 ± 0.05/0.19 ± 0.05/0.27 ± 0.06	0.48 ± 0.28/0.50 ± 0.17	–
II/CS	0.59 ± 0.12	0.29 ± 0.07/0.27 ± 0.07/0.40 ± 0.11	2.27 ± 1.30/2.10 ± 0.18	0.36 ± 0.10
III/CS	0.46 ± 0.29	0.76 ± 0.25/1.21 ± 0.31/1.33 ± 0.46	1.53 ± 0.79/1.08 ± 0.26	0.79 ± 0.25
IV/CS	4.90 ± 0.56	0.90 ± 0.24/0.86 ± 0.21/1.02 ± 0.32	1.28 ± 0.66/0.95 ± 0.19	1.12 ± 0.22
IV/I	7.30 ± 1.54	4.87 ± 1.51/4.99 ± 1.20/3.79 ± 1.30	2.91 ± 1.03/2.11 ± 0.79	–

n: number of samples; [1,2,3] data provided by the diagnostic center in La Salpêtrière hospital[1], Paris, in CHU d'Angers[2], and in CHU de Caen[3]; values of activities are expressed as mean ± standard deviation and as nanomoles per minute and per milligram protein; I: respiratory complex I activity, i.e. rotenone-sensitive NADH ubiquinone oxidoreductase activity; II: respiratory complex II activity, i.e. succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity; III: respiratory complex III activity, i.e. antimycin-sensitive ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase activity; IV: respiratory complex IV activity, i.e. cytochrome *c* oxidase activity; I + III: rotenone-sensitive NADH cytochrome *c* oxidoreductase activity; II + III: succinate cytochrome *c* oxidoreductase activity; CS: citrate synthase activity; I/CS, II/CS, III/CS, IV/CS, and IV/I are the ratios of the corresponding activities; –: data not available. Whatever the experimental conditions tested, rotenone sensitive I activity in control human skin fibroblasts suspension could appear to be null. This assay was therefore considered unreliable in these cell preparations. *: data obtained on only three samples.

ing consistent and reproducible testing of mitochondrial function in patients with a suspected mitochondrial disorder.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from INSERM, the AFM (Association Française contre les Myopathies) and the GIS-Maladies rares. We thank Dr. Nigel Clarke for his most useful comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mito.2009.05.001.

References

Auré, K., Mamchaoui, K., Frachon, P., Butler-Browne, G.S., Lombès, A., Mouly, V., 2007. Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. Neuromusc Disord 17, 368–375.

Bénit, P., Goncalves, S., Dassa, E.P., Brière, J.J., Martin, G., Rustin, P., 2006. Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minute biological samples. Clin Chim Acta 374, 81–86.

Birch-Machin, M.A., Shepherd, I.M., Watmough, N.J., Sheratt, H.S.A., Bartlett, K., Darley-Usmar, V.M., Milligan, D.W.A., Welch, R.J., Aynsley-Green, A., Turnbull, D.M., 1989. Fatal lactic acidosis in infancy with a defect of complex III of the respiratory chain. Pediatr Res 25, 553–559.

Chretien, D., Bourgeron, T., Rötig, A., Munnich, A., Rustin, P., 1990. The measurement of the rotenone-sensitive NADH cytochrome *c* reductase activity in mitochondria isolated from minute amount of human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 173 (1), 26–33.

Chretien, D., Slama, A., Briere, J.J., Munnich, A., Rotig, A., Rustin, P., 2004. Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. Curr Med Chem 11 (2), 233–239.

DiMauro, S., Hirano, M., 2005. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. Neuromusc Disord 15 (4), 276–286.

Estabrook, R.W., Pullman, M.E., 1967. Oxidation and Phosphorylation. Academic Press, New York, London.

Gellerich, F.N., Mayr, J.A., Reuter, S., Sperl, W., Zierz, S., 2004. The problem of interlab variation in methods for mitochondrial disease diagnosis: enzymatic measurement of respiratory chain complexes. Mitochondrion 4 (5–6), 427–439.

Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenborg-Hogenkamp, B.J., Rodenburg, R.J., 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. Clin Chem 53 (4), 729–734.

Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., 2007. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. Method Cell Biol 80, 93–119.

Krahenbuhl, S., Talos, C., Wiesmann, U., Hoppel, C.L., 1994. Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans. Clin Chim Acta 230 (2), 177–187.

Kramer, K.A., Oglesbee, D., Hartman, S.J., Huey, J., Anderson, B., Magera, M.J., Matern, D., Rinaldo, P., Robinson, B.H., Cameron, J.M., Hahn, S.H., 2005. Automated spectrophotometric analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities in cultured skin fibroblasts. Clin Chem 51 (11), 2110–2116.

Kubota, T., Yoshikawa, S., Matsubara, H., 1992. Kinetic mechanism of beef heart ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase. J Biochem 111 (1), 91–98.

Letellier, T., Malgat, M., Coquet, M., Moretto, B., Parrot-Roulaud, F., Mazat, J.P., 1992. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. Pediatr Res 32 (1), 17–22.

Lombès, A., Nakase, H., Tritschler, H.J., Kadenbach, B., Bonilla, E., DeVivo, D.C., Schon, E.A., DiMauro, S., 1991. Biochemical and molecular analysis of cytochrome *c* oxidase deficiency in Leigh's syndrome. Neurology 41, 491–498.

Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A.V., 1998. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. Free Radical Biol Med 25 (6), 666–675.

Romero, N.B., Lombès, A., Touati, G., Rigal, O., Frachon, P., Cheval, M.A., Giraud, M., Possekel, S., Fardeau, M., Ogier de Baulny, H., 1996. Morphological studies of skeletal muscle in lactic acidosis. J Inher Metab Dis 19, 528–534.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta 228 (1), 35–51.

Smith, A., 1967. Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small-scale. Method Enzymol 10, 81–86.

Taylor, R.W., Birch-Machin, M.A., Bartlett, K., Lowerson, S.A., Turnbull, D.M., 1993. Succinate-cytochrome *c* reductase: assessment of its value in the investigation of defects of the respiratory chain. Biochem Biophys Acta 1181, 261–265.

Taylor, R.W., Birch-Machin, M.A., Bartlett, K., Turnbull, D.M., 1994. The control of mitochondrial oxidations by complex III in rat muscle and liver mitochondria. Implications for our understanding of mitochondrial cytopathies in man. J Biol Chem 269 (5), 3523–3528.

Taylor, R.W., Schaefer, A.M., Barron, M.J., McFarland, R., Turnbull, D.M., 2004. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. Neuromusc Disord 14 (4), 237–245.

Touati, G., Rigal, O., Lombès, A., Frachon, P., Giraud, M., Ogier de Baulny, H., 1997. In vivo functional investigations of lactic acid in patients with respiratory chain disorders. Arch Dis Child 76, 16–21.

Trijbels, J.M., Scholte, H.R., Ruitenbeek, W., Sengers, R.C., Janssen, A.J., Busch, H.F., 1993. Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial (encephalo)-myopathies. Eur J Pediatr 152 (3), 178–184.

Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S., Wallace, D.C., 1996. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. Method Enzymol 264, 484–509.

Wibom, R., Hagenfeldt, L., von Dobeln, U., 2002. Measurement of ATP production and respiratory chain enzyme activities in mitochondria isolated from small muscle biopsy samples. Anal Biochem 311 (2), 139–151.

Williams, A.J., Coakley, J., Christodoulou, J., 1998. Automated analysis of mitochondrial enzymes in cultured skin fibroblasts. Anal Biochem 259 (2), 176–180.

Zheng, X., Shoffner, J.M., Voljavec, A.S., Wallace, D.C., 1990. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathies muscle biopsies. Biochem Biophys Acta 1019, 1–10.

ATELIER C

Quantification de gènes mitochondriaux et nucléaires par PCR quantitative en temps réel

Application à la quantification des délétions et déplétions de l'ADN mitochondrial

Valérie DESQUIRET
CHU Angers
VaDesquiret@chu-angers.fr

Bénédicte MOUSSON de CAMARET
CHU Lyon
benedicte.mousson-de-camaret@chu-lyon.fr

Institut Cochin
INSERM U1016 - CNRS UMR 8104
Université Paris Descartes
Paris 17-19 octobre 2013

I. Principe de la technique de PCR quantitative en temps réel

La quantification de gènes de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans les tissus et cellules, est réalisée par une technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR). Cette technique est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. : SYBR Green I) et les sondes fluorescentes.

I.1. Méthodologie de détection

C'est le principe du SYBR Green se liant à l'ADN double brin qui a été choisi dans la présente méthodologie (**Figure 1**). L'émission fluorescente augmente lorsque le SYBR Green est lié à l'ADN double brin.

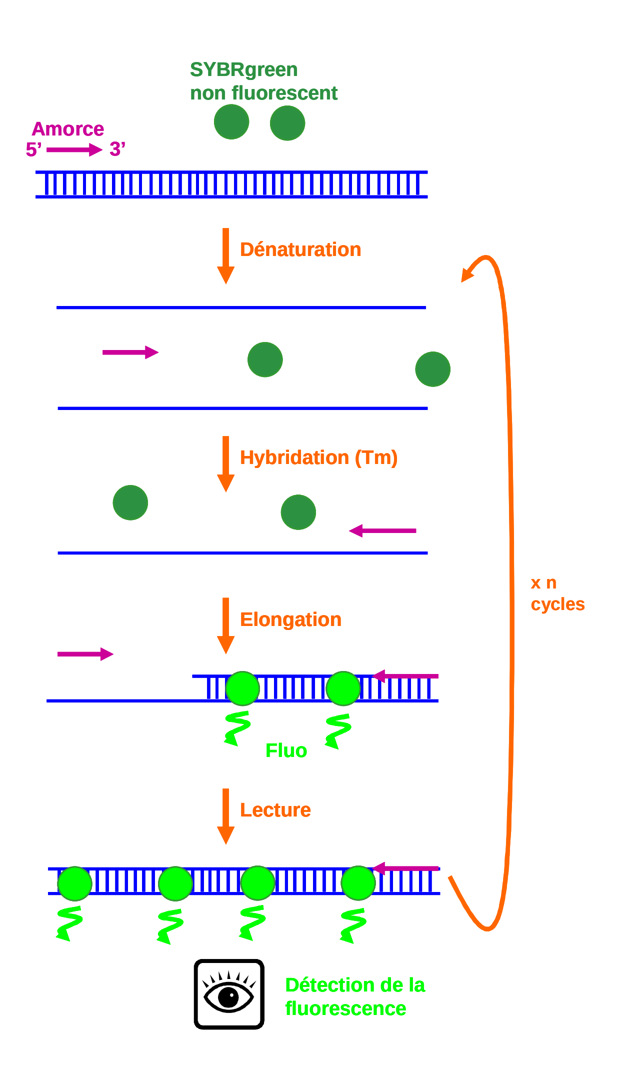


Figure 1 : Principe de la détection de la fluorescence du SYBR Green I

L'augmentation du signal de fluorescence, émise par le SYBR Green I, est observée pendant l'étape de polymérisation de la PCR lorsque cette molécule est fixée à l'ADN, et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation, pour chacun des cycles, par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel, ce qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction de PCR.

On obtient alors à la fin du programme de PCR, une courbe exponentielle représentant l'augmentation de la fluorescence en fonction du nombre de cycles de PCR effectués.

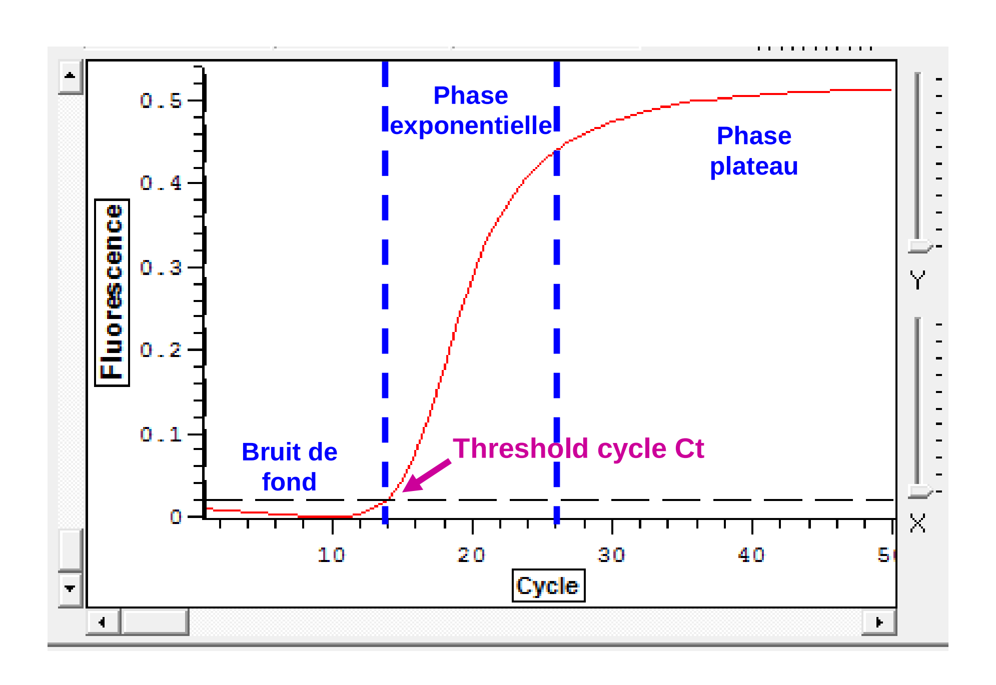


Figure 2 : Courbe de détection de la fluorescence en fonction du nombre de cycles de PCR

I.2. Caractéristiques de la qPCR

I.2.1. Le cycle seuil (ou crossing point) : le concept de "cycle seuil" est à la base d'une quantification précise et reproductible. A chaque cycle, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration d'amplicons produits. Le cycle seuil (Ct) (threshold cycle) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est significativement plus élevé que la ligne de base (**Figure 2**). Le cycle seuil est également appelé « crossing point » (Cp) et correspond au nombre virtuel de cycles où chaque échantillon contient le même nombre de produits de PCR.

Plus il y a de copies d'ADN à amplifier, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre le Ct où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond.

Puis au cours de la phase exponentielle, la quantité d'ADN présent double à chaque cycle.

I.2.2. La courbe de fusion : à la fin de la qPCR, une courbe de fusion est réalisée. Cette étape consiste en une augmentation progressive de la température du bloc du thermocycleur avec une lecture de la fluorescence à chaque degré. Au cours de cette étape, l'ADN double brin se dissocie à une température qui lui est propre (Tm : température à laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié) et qui dépend notamment de sa composition nucléotidique. A cette température, appelée température de fusion, l'intercalant (SYBR Green I) est libéré et la fluorescence chute brutalement. Un seul pic au niveau de la courbe de fusion signifie qu' un seul produit a été amplifié et que la PCR est spécifique (**Figure 3A**). En revanche, si l'amplification n'est pas spécifique, un ou plusieurs autres pics seront mis en évidence sur la courbe de fusion. La présence éventuelle de dimères d'amorces peut être également repérée sur la courbe de fusion (**Figure 3B**).

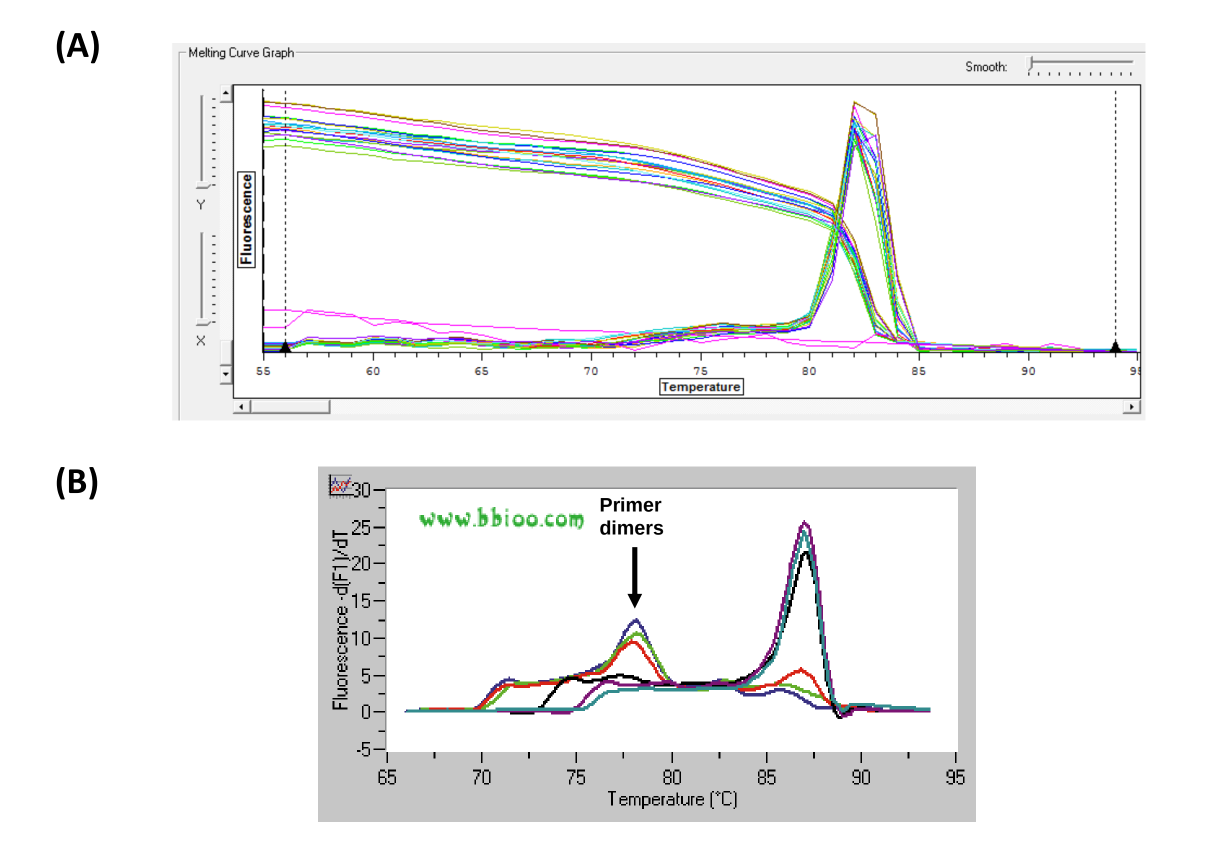


Figure 3 : Exemple de courbe de fusion
(A) Amplification d'un seul produit (B) Amplification de deux produits

I.2.3. L’aspect quantitatif : la quantification proprement dite des produits de qPCR peut se faire selon deux conceptions :

- quantification relative : elle s’effectue par mesure d’un gène cible par rapport à un gène de référence et on établit un rapport entre les Ct (ou Cp) du gène cible et du gène de référence pour chaque échantillon en tenant compte des efficacités des deux PCR.
- quantification avec standard externe : il existe une relation linéaire entre les valeurs de Ct (Cp) obtenues expérimentalement à partir des différentes dilutions d’un échantillon de calibrateur (plasmide), et le log de la concentration de chacune des dilutions, exprimée en nombre de copies par volume total (en µl) de mélange réactionnel. L’équation de la droite d’étalonnage est :

$$\mathbf{Ct} \text{ (ou } \mathbf{Cp}\text{)} = -(1/\log\mathbf{E}) \times \log\mathbf{T_0} + (\log K/\log E)$$

Ct (= **y**) : valeur du cycle seuil (crossing point) obtenue expérimentalement
$\mathbf{T_0}$ (= **x**) : quantité initiale d’ADN en nombre de copies / 20 µl de réaction
-1/log**E** (= pente de la droite)

E = Efficacité de la qPCR. L’efficacité maximale de 100% est obtenue pour **E** = 2 et la pente de la droite est alors égale à -3,33. Expérimentalement, on tolère une efficacité entre 1,85 et 2 (**Figure 4 :** pente = -3,305 pour une efficacité de 2,01).

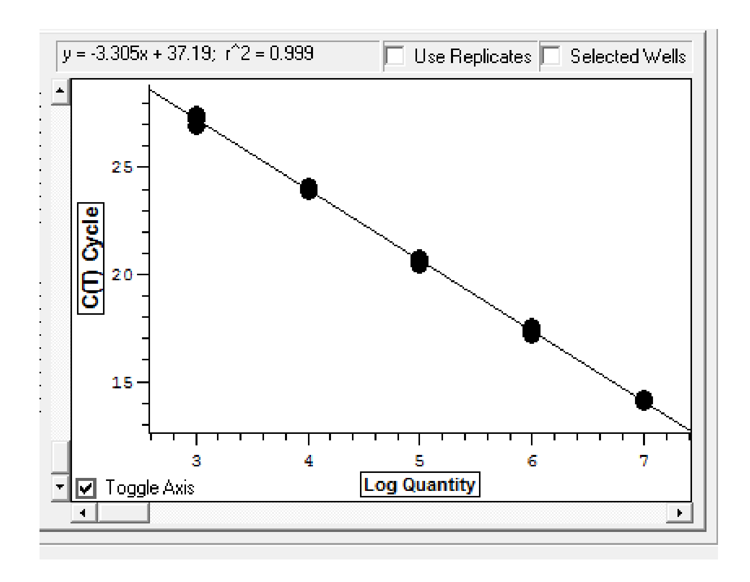


Figure 4 : Droite d’étalonnage obtenue à partir de 5 dilutions de plasmide-calibrateur (10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 copies / µl)

Plus le coefficient de régression est proche de 1, plus la gamme est linéaire sur l'ensemble des points. Cette droite d'étalonnage renseigne surtout sur l'efficacité de la qPCR (**E**). En effet, durant la phase linéaire, la quantité d'ADN doit théoriquement doubler à chaque cycle avec une efficacité maximale de 100% (**E**=2). Plus la pente négative est faible, moins la PCR est efficace ; en pratique, on considère qu'une pente inférieure à -3,6 (c'est-à-dire 90% d'efficacité) n'est pas acceptable.

Les efficacités de chaque échantillon d'une série de quantification devront être comparables pour une interprétation correcte des données entre elles. Pour corriger la différence d'efficacité des échantillons à l'intérieur d'une série, le nombre de copies de chaque échantillon d'intérêt sera rapporté, pour chaque gène quantifié, à la moyenne des copies de deux ADNs contrôles.

I.2.4. L'optimisation du programme de q-PCR : des mises au point sont nécessaires pour obtenir une qualité et une efficacité de PCR maximales. Etant donné que les conditions optimales de mesure ne sont pas transférables d'un appareil de qPCR à l'autre, les échantillons devront être analysés sur le même appareil qui a servi pour les mises au point préalables.

L'optimisation concerne les paramètres suivants :

- spécificité de l'amplicon : elle devra être vérifiée par PCR classique, dépôt sur gel de l'amplicon (évaluation de la taille) et séquençage (séquence appropriée)
- température d'hybridation (T_H) des amorces et concentration de $MgCl_2$: elles devront être optimisées pour obtenir :

1) une courbe de fusion spécifique pour chaque produit de PCR
2) des gammes d'étalonnage avec une efficacité maximale (pente la plus proche de -3,33).

II. Matériel et Méthodes

II.1. Echantillons d'ADNs

Les ADNs des contrôles et des patients sont extraits à partir soit de fibroblastes cutanés cultivés soit de muscle squelettique.
- contrôles : ADNs témoins extraits de fibroblastes ou de muscle
- patients : ADNs de patients correspondant à trois types de situation :
1) déplétion de l'ADNmt : fibroblastes des patients 1 et 2
2) délétion hétéroplasmique de l'ADNmt : muscle du patient 4 porteur de la délétion commune de 4977 paires de base (nt 8482 - nt 13460)
3) ni délétion, ni déplétion : muscle du patient 3

II.2. Précautions préliminaires

La qPCR est une technique très sensible permettant de détecter seulement quelques copies d'ADN (mitochondrial ou nucléaire). Il est donc impératif de travailler dans un environnement totalement exempt d'ADN contaminant. Pour cela, avant chaque manipulation, le plan de travail ainsi que les pipettes seront nettoyés avec une solution « DNA away » ou toute autre solution permettant d'éliminer toutes traces d'ADN. Il est aussi indispensable d'utiliser des pointes à filtres pour éviter les aérosols pouvant contaminer les pipettes. Le port de gants et éventuellement d'une blouse à manches resserrées, est également impératif.

Les plasmides utilisés pour les gammes d'étalonnage étant très concentrés en ADN, ils représentent une source importante de contamination. Il est indispensable de les manipuler avec le maximum de précautions : centrifuger brièvement les tubes eppendorf avant ouverture pour faire tomber les gouttes au fond, aucune ouverture brusque des tubes en particulier à proximité d'autres tubes ouverts, changement de gants après chaque manipulation de plasmides.

II.3. Choix des gènes quantifiés

Lors de cet atelier, l'amplification a porté sur :
- deux gènes mitochondriaux : *MT-CO1* (*COXI*), gène codant pour la cytochrome oxydase I (sous-unité I du complexe IV de la chaîne respiratoire) et *MT-ND4* (*ND4*), gène codant pour la « mitochondrially-encoded NADH dehydrogenase 4 » (sous-unité 4 du complexe I).
- un gène nucléaire : *B2M*, gène codant pour la Beta-2-microglobuline.

Pour le diagnostic des anomalies qualitatives et quantitatives de l'ADNmt, le protocole de qPCR des échantillons de patients dépendra du type d'anomalie recherchée :

1) <u>délétions hétéroplasmiques de l'ADNmt</u> (coexistence au sein d'un tissu d'ADNmt délété et d'ADNmt non délété) : détermination du nombre de copies de deux gènes extra-délétion (exemple : *16S* et *ND2* pour la quantification de l'ADNmt total) et de deux gènes intra-délétion (ex : *COXI* et *ND4* pour la quantification de l'ADNmt délété à condition que la délétion englobe ces deux gènes ; sinon, on choisit deux autres gènes intra-délétion, par exemple *ND4* et *ND5* pour la 1ère délétion comnune).

2) <u>déplétion de l'ADNmt</u> : détermination du nombre de copies de trois gènes mitochondriaux (ex : *16S*, *ND2* et *COXI*) rapportées à un ou deux gènes nucléaires de référence (ex : *B2M* et/ou *ATP5B*).

II.4. Choix des amorces

Dénomination du gène	Position des amorces	Séquence nucléotidique 5'→3'	Taille de l'amplicon
COXI	For[1] mt.7017*	TACGTTGTAGCCCACTTCCACT	208 pb
	Rev[2] mt. 7224*	AGTAACGTCGGGGCATTCCG	
ND4	For mt.11297*	ACTCTCACTGCCCAAGAACT	205 pb
	Rev mt.11501*	GTGTGAGGCGTATTATACCA	
B2M	For exon 3 -112	CAGCCTATTCTGCCAGCC	239 pb
	Rev exon 3 +113	CAATGTTCTCCACATAGTGAGGG	

[1] Forward ou sens ; [2] Reverse ou antisens
*position du nucléotide en 5' de l'amorce sur l'ADNmt

II.5. Matériel

- Plasmides recombinants étalons pour chaque gène d'intérêt : *COXI*, *ND4* et *B2M* à la concentration de 10^{10} copies/µl
- IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad)
- DNA away Surface Decontaminant, Thermo Scientific
- H_20 DEPC
- Pipettes de précision mLine Biohit (2, 10, 20, 100 et 1000 µl) (Sartorius)
- Pointes à filtres ART, Softfit-L (10 µl, 20µl, 100 µl et 1000 µl) (VWR)
- Microtubes 1,5 ml DNAse free (Safelock Eppendorf)
- Bloc froid
- Appareil de PCR quantitative MyiQ Real-Time PCR system (Bio-Rad)
- Plaque et film optique adaptés à l'appareil de qPCR : Multiplate Low-Profile plates (white) et Microseal C Optical Seal (Bio-rad)

II.6. Protocole opératoire

II.6.1. Courbes d'étalonnage

Les ADN de plasmides, *COXI*, *ND4* et *B2M* (10^{10} copies/µl) sont dilués au 1/10e en cascade de manière à obtenir des concentrations de 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 et 10^3 copies/µl. Pour cela, 5 µl d'ADN de la concentration 10 fois supérieure sont ajoutés à 45 µl d'eau DEPC.

II.6.2. Préparation du mélange réactionnel

Pour chaque gène quantifié, on prépare 19 µl de mélange réactionnel dans un bloc froid. On ajoute à ce mélange, 1 µl d'ADN du patient à 50 ng/µl ou d'une dilution de plasmide.

Réactif	**Concentration initiale**	**Concentration finale**	**Volume pour 1 puit**	**Volume pour n puits**
IQ SYBR Green supermix	2X	1X	10 µl	
Amorce For	10 µM	500 nM	1 µl	
Amorce Rev	10 µM	500 nM	1 µl	
H_2O DEPC			7 µl	
V du mélange réactionnel			**19 µl**	
ADN			1 µl	
V final			**20 µl**	

- Distribuer 19 µl de mélange réactionnel dans les puits suivant le plan de plaque fourni et ajouter 1 µl d'ADN plasmidique ou d'ADN du patient.
- Sceller la plaque à l'aide du film plastique optique, en prenant garde à ne pas le repositionner (risque de contamination).
- Centrifuger brièvement la plaque pour faire tomber toutes les gouttes au fond des puits.
- Placer dans l'appareil de PCR quantitative.
- Lancer le logiciel Opticon Monitor ; l'onglet « **Master File** » s'ouvre et permet d'avoir accès au plan de plaque et au protocole utilisé (**Figure 5**).

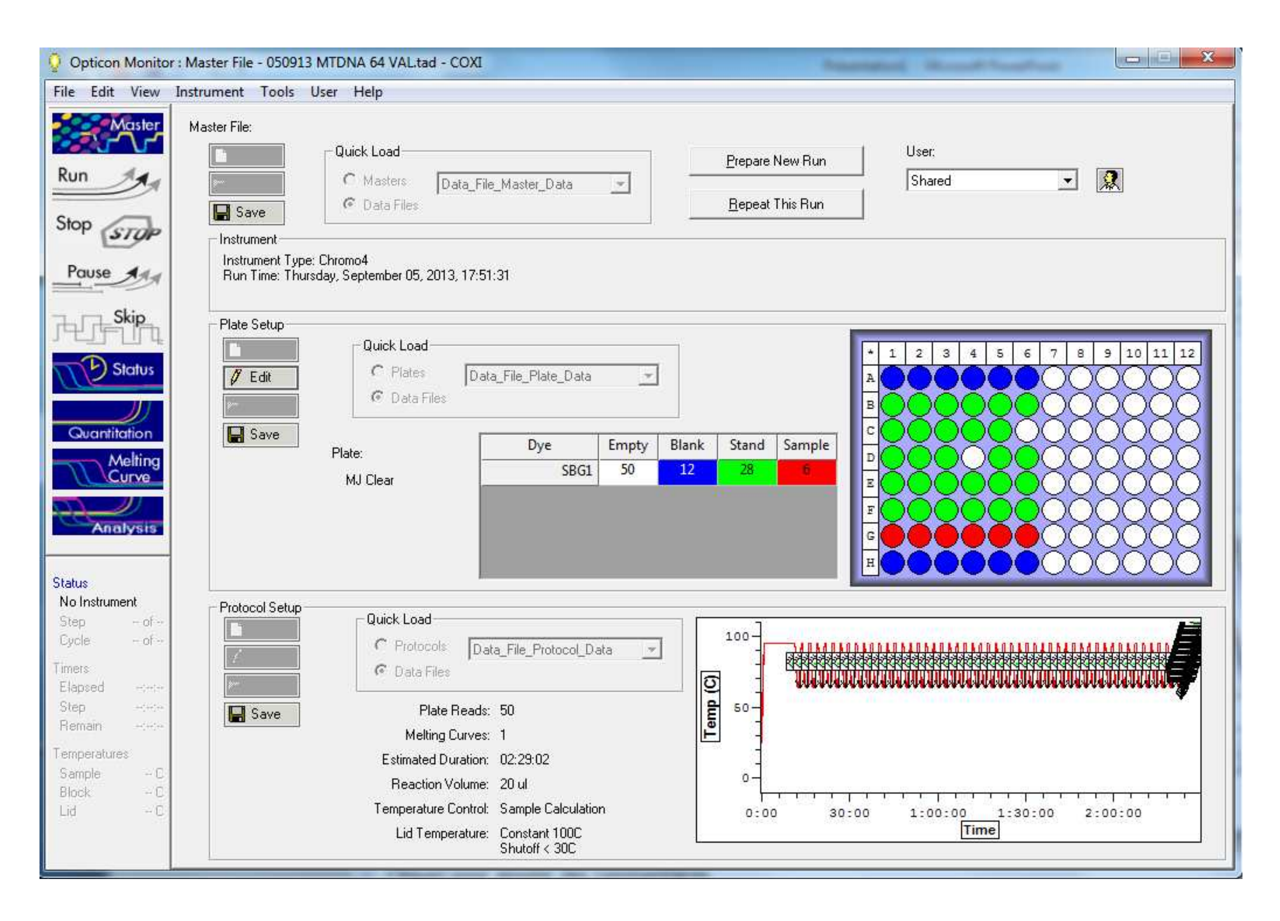


Figure 5 : Onglet "Master File" du logiciel Opticon Monitor (Bio-Rad)

- Dans l'onglet "**Plate Setup**", cliquer sur Edit pour annoter le plan de plaque (**Figure 6**).
+ dans le cadre "**Dyes**", choisir SBG1 (SYBR Green I).
+ indiquer le type d'échantillon contenu dans le puits en sélectionnant les puits et en cliquant sur la couleur correspondante : les puits contenant de l'eau (Blank) seront matérialisés en bleu "**B**", ceux contenant les points de gamme (Standard) en vert "**Std**" et ceux qui contiennent les échantillons (Sample) seront matérialisés en rouge "**Sa**".
+ indiquer le nom des échantillons dans le tableau de droite et cliquer sur "Specify Quant Standards" pour rentrer les valeurs des différents points de gamme.

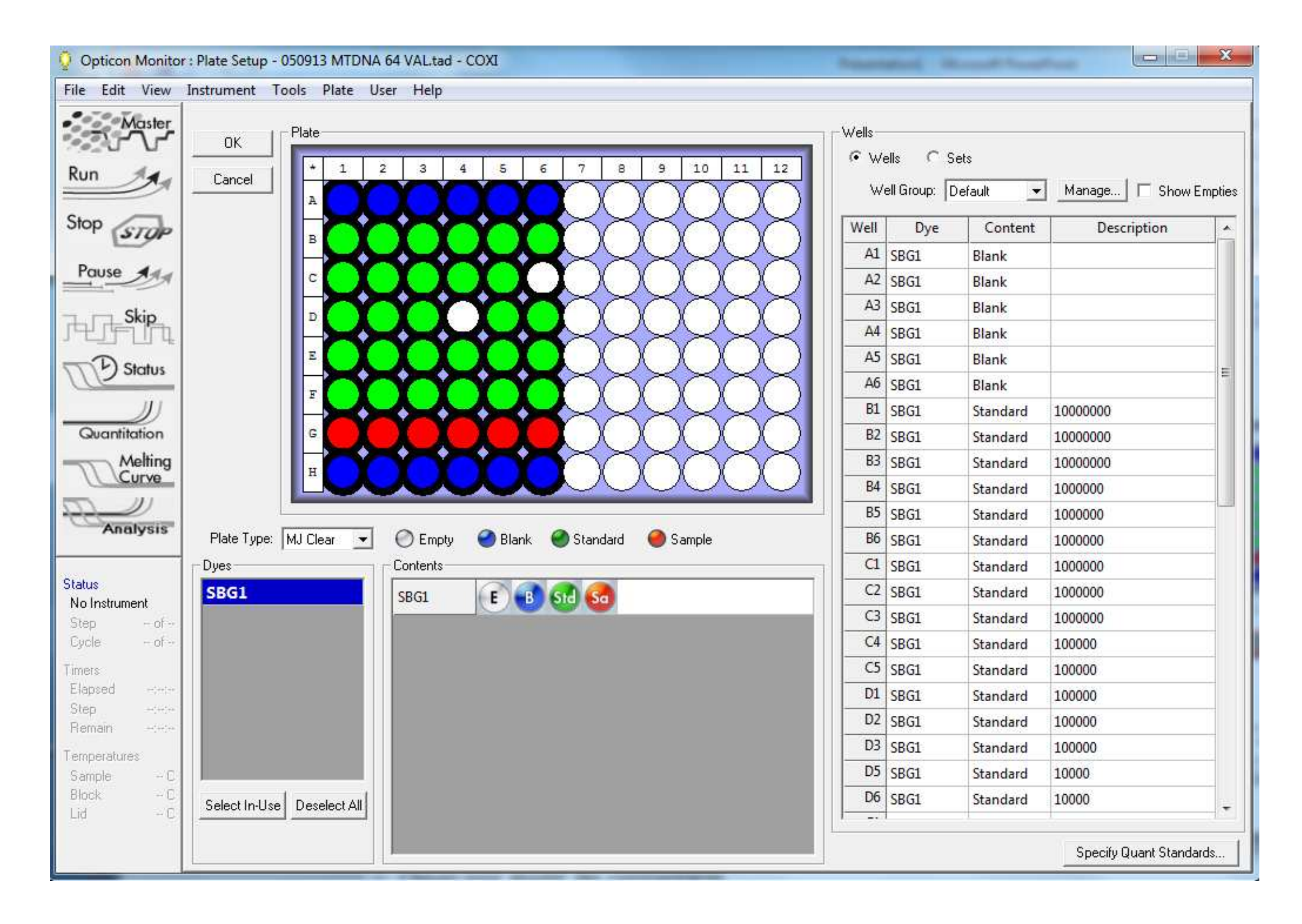


Figure 6 : Onglet "Plate Setup" du logiciel Opticon Monitor

- Dans l'onglet "**Protocol Setup**", on introduit les conditions du programme PCR : + line 1 : 95°C , 10 minutes
  + line 2 : 95°C, 30 secondes
  + line 3 : 64°C, 1 minute

Puis : + plate read
+ revenir à la line 2 et ajouter 49 more times (soit 50 cycles en tout)
+ melting curve : 55°C to 95°C, read plate every 1°C, hold 1 seconde

Le programme de 50 cycles de PCR dure environ deux heures.

II.7. Interprétation des résultats

Les résultats, obtenus après amplification des gènes mitochondriaux *COXI* et *ND4* et du gène nucléaire *B2M,* comportent trois volets :

1) la courbe de fusion de chaque gène
2) les courbes d'amplification
3) les tableaux de quantification.

Grâce à ces données, pourront être calculés les rapports entre le nombre de copies des gènes mitochondriaux et celui du gène nucléaire qui sert de référence pour les contrôles et les patients.

II.7.1. Courbes de fusion : il est possible de visualiser la courbe de fusion ou "melting curve" après le run, en cliquant sur l'onglet "**Melting Curve**" (**Figure 7**).

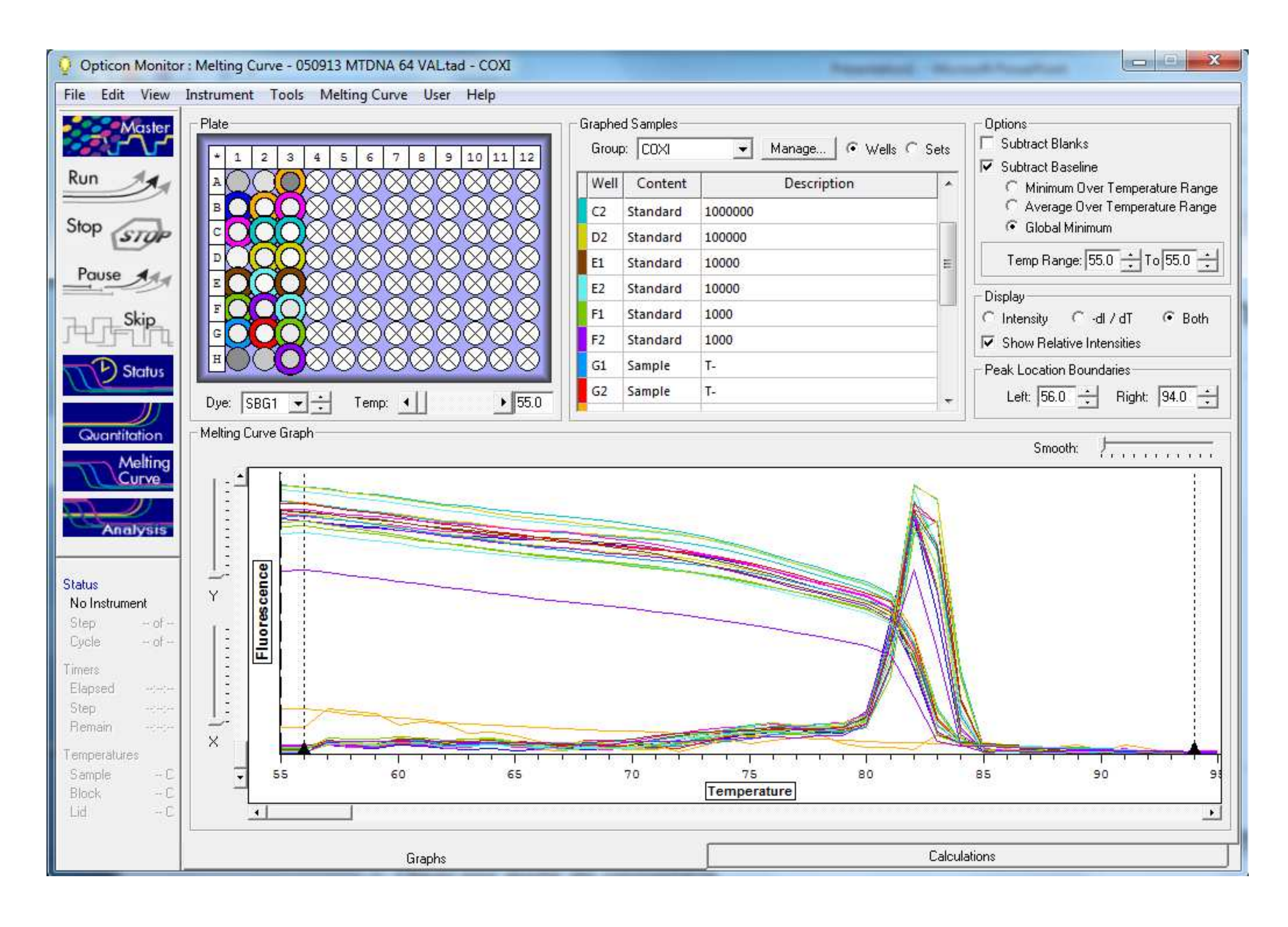
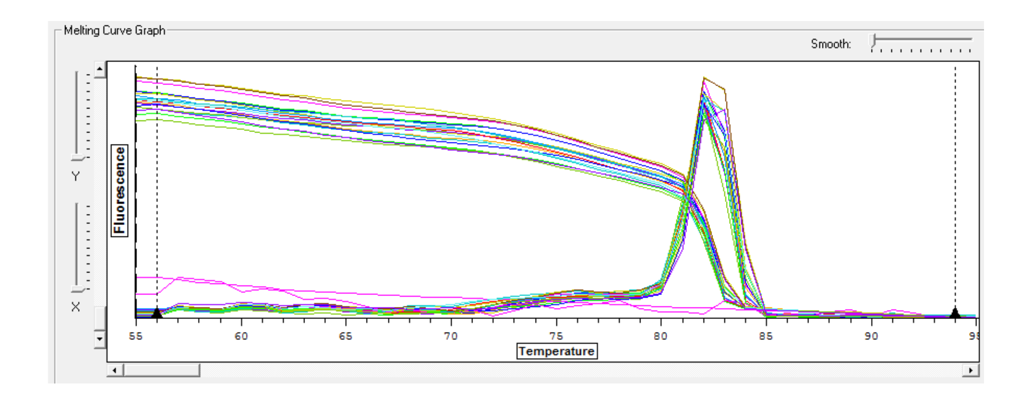


Figure 7 : Onglet "Melting curve" du locigiel Opticon Monitor (Bio-Rad)

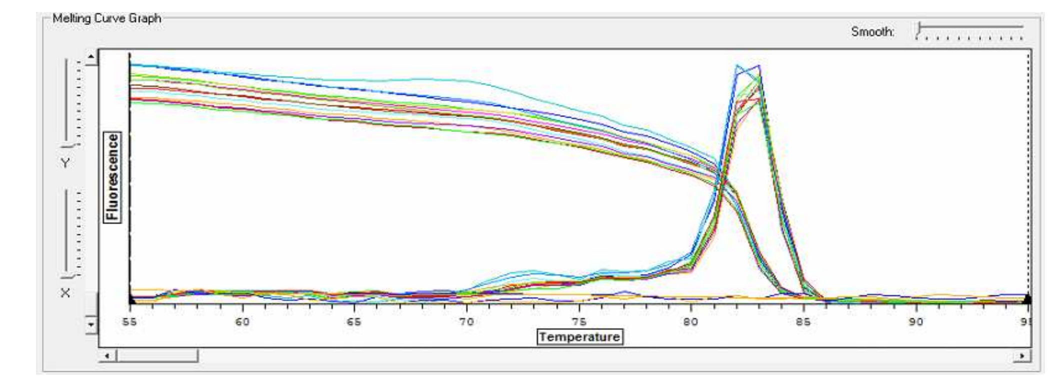
Des exemples de courbes de fusion obtenues pour les trois gènes d'intérêt sont reproduits ci-dessous. Une interprétation des **courbes de fusion** est proposée aux participants.





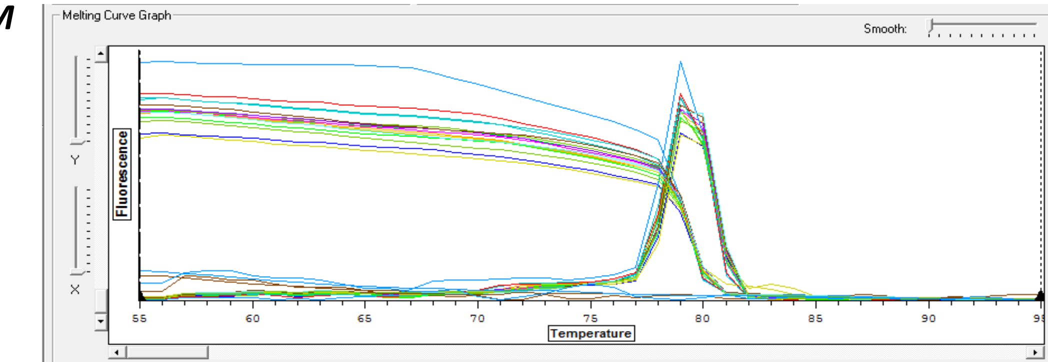
Interprétation

ND4



Interprétation

B2M



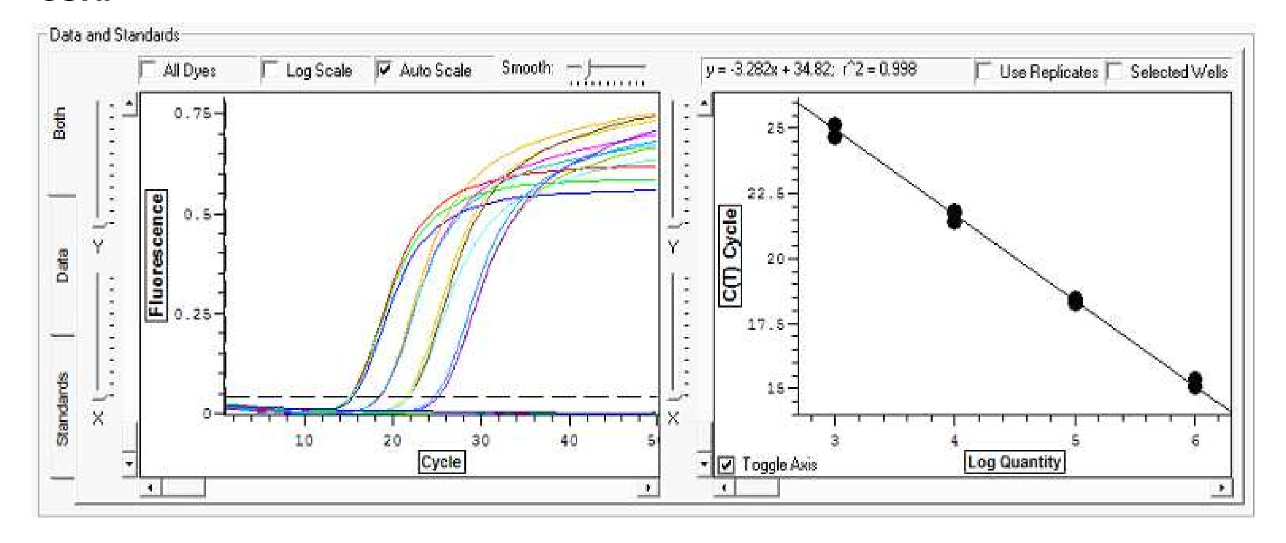
Interprétation

II.7.2. Gammes d'étalonnage : ces données peuvent être visualisées dans l'onglet "**Quantitation/Graph**" (**Figure 8**).

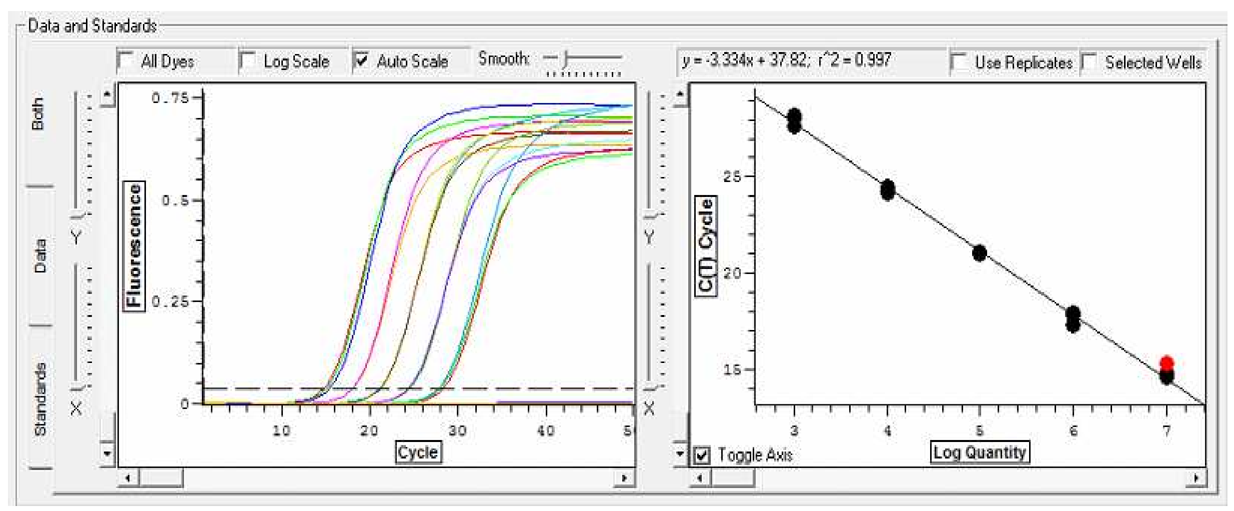
Figure 8 : Onglet "Quantitation/Graph" du logiciel Opticon Monitor (Bio-Rad)

Les résultats obtenus pour les gammes d'étalonnage des trois gènes étudiés figurent ci-dessous.

COXI

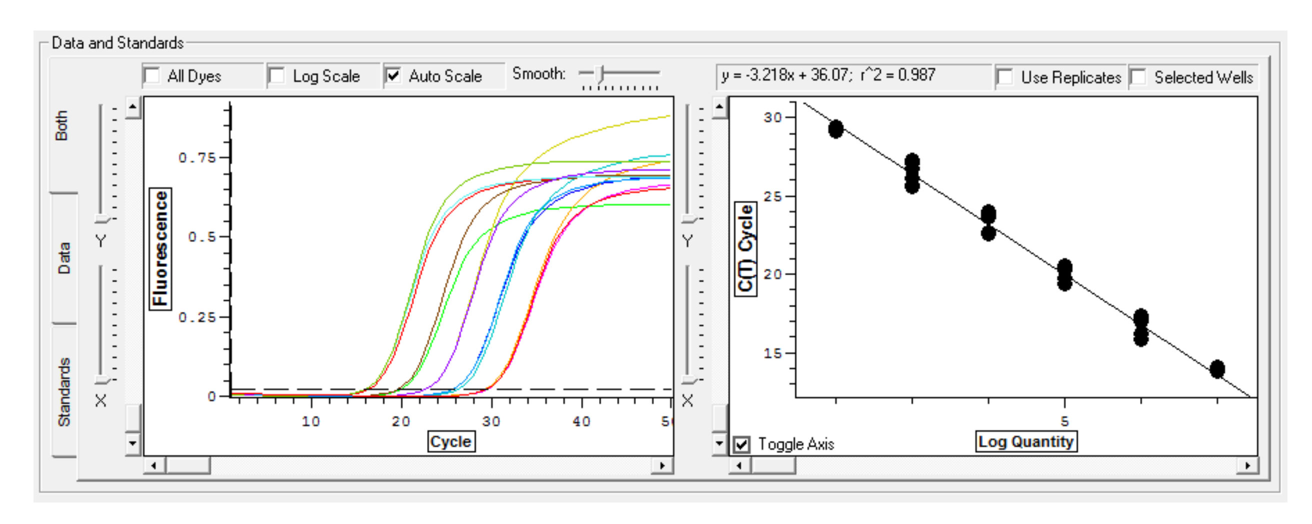


ND4



● **point aberrant supprimé**

B2M



Une interprétation des **gammes d'étalonnage** est proposée aux participants.

COXI

ND4

B2M

II.7.3. Résultats quantitatifs : les résultats des Ct (ou Cp) et du nombre de copies d'ADN des échantillons peuvent être visualisés dans l'onglet "**Quantitation/Calculations**" du logiciel Opticon (**Figure 9**). Ces données peuvent être exportées dans un fichier Excel par Copier/Coller en cliquant sur Copy to clipboard.

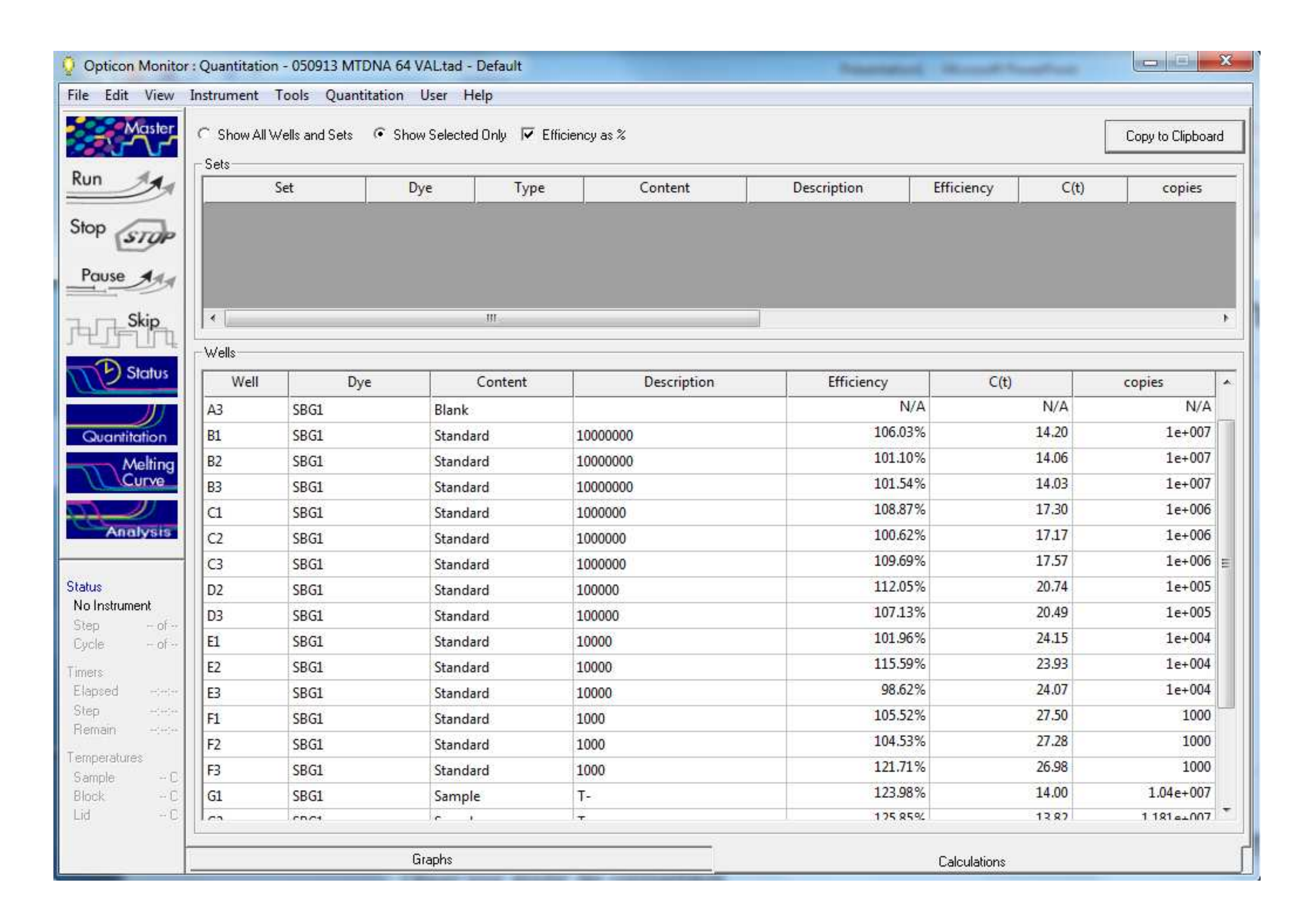


Figure 9 : Onglet "Quantitation/Calculations"
du logiciel Opticon Monitor (Bio-Rad)

Le retraitement des données figure dans le tableau I, extrait du fichier Excel. Une interprétation des **résultats quantitatifs** pour les trois gènes *COXI*, *ND4* et *B2M,* est proposée aux participants.

Tableau I : Retraitement des données quantitatives

COX I				
Content	Description	Efficiency	C(t)	copies
Blank	Neg	N/A	N/A	
Fibroblastes				
Sample	Temoin fibro	120.29%	13.88	1.61E+05
Sample	Temoin fibro	106.6%	14.31	1.19E+05
Sample	Temoin fibro	131.24%	13.88	1.61E+05
Sample	Patient 1	134.94%	19.96	2.20E+05
Sample	Patient 1	99.71%	20.07	2.03E+05
Sample	Patient 1	126.44%	19.93	2.24E+05
Sample	Patient 2	142.84%	16.82	2.02E+04
Sample	Patient 2	154.26%	16.81	2.04E+04
Sample	Patient 2	93.24%	17.72	1.24E+04
Biospies musculaires				
Sample	Temoin muscle	111.37%	10.08	3.53E+08
Sample	Temoin muscle	121.34%	10.32	2.91E+08
Sample	Temoin muscle	121.29%	9.15	5.37E+08
Sample	Patient 3	111.37%	10.08	3.53E+08
Sample	Patient 3	121.34%	10.32	2.91E+08
Sample	Patient 3	146.04%	9.89	3.94E+08
Sample	Patient 4	132.31%	7.93	2.10E+09
Sample	Patient 4	111.46%	8.04	1.92E+09
Sample	Patient 4	148.43%	7.74	2.48E+09

ND4				
Content	Description	Efficiency	C(t)	copies
Blank	Neg	N/A	N/A	
Fibroblastes				
Sample	Temoin fibro	93.26%	13.48	1.99E+07
Sample	Temoin fibro	93.09%	13.54	1.92E+07
Sample	Temoin fibro	93.25%	13.47	2.00E+07
Sample	Patient 1	113.21%	19.40	3.34E+05
Sample	Patient 1	115.27%	19.37	3.41E+05
Sample	Patient 1	87.22%	20.01	7.32E+04
Sample	Patient 2	97.22%	16.60	2.32E+06
Sample	Patient 2	99.64%	16.59	2.33E+06
Sample	Patient 2	96.55%	16.67	2.20E+06
Biospies musculaires				
Sample	Temoin muscle	111.37%	10.08	3.53E+08
Sample	Temoin muscle	121.38%	10.34	2.88E+08
Sample	Temoin muscle	177.77%	10.40	2.52E+08
Sample	Patient 3	206.39%	7.46	4.83E+08
Sample	Patient 3	170.56%	7.88	3.49E+08
Sample	Patient 3	96.39%	7.56	3.71E+08
Sample	Patient 4	118.51%	13.27	5.45E+06
Sample	Patient 4	106.21%	13.07	6.37E+06
Sample	Patient 4	89.12%	13.51	3.82E+06

B2M				
Content	Description	Efficiency	C(t)	copies
Blank	Neg	N/A	N/A	
Fibroblastes				
Sample	Temoin fibro	96.15%	21.55	5.77E+04
Sample	Temoin fibro	98.26%	21.70	5.18E+04
Sample	Temoin fibro	83.55%	21.41	6.01E+04
Sample	Patient 1	148.32%	17.95	6.93E+05
Sample	Patient 1	105.19%	18.05	6.47E+05
Sample	Patient 1	107.71%	18.03	6.55E+05
Sample	Patient 2	93.55%	21.01	8.37E+04
Sample	Patient 2	90.89%	21.13	7.70E+04
Sample	Patient 2	106.51%	20.96	8.63E+04
Biospies musculaires				
Sample	Temoin muscle	107.12%	19.26	1.07E+05
Sample	Temoin muscle	100.30%	19.29	1.05E+05
Sample	Temoin muscle	107.85%	19.23	1.09E+05
Sample	Patient 3	129.57%	18.52	1.77E+05
Sample	Patient 3	130.94%	18.48	1.82E+05
Sample	Patient 3	116.44%	18.41	1.91E+05
Sample	Patient 4	124.72%	18.49	1.80E+05
Sample	Patient 4	133.45%	18.36	1.97E+05
Sample	Patient 4	128.95%	18.48	1.82E+05

Interprétation des résultats

- Examen critique des triplicates
- Rapports du nombre de copies des patients / contrôles internes
- Moyenne du nombre de copies des gènes mitochondriaux
- Rapport du nombre de copies de l’ADNmt / gène nucléaire
- Rapport des gènes ADNmt intra-délétion / gènes ADNmt extra-délétion

+ Patient 1

+ Patient 2

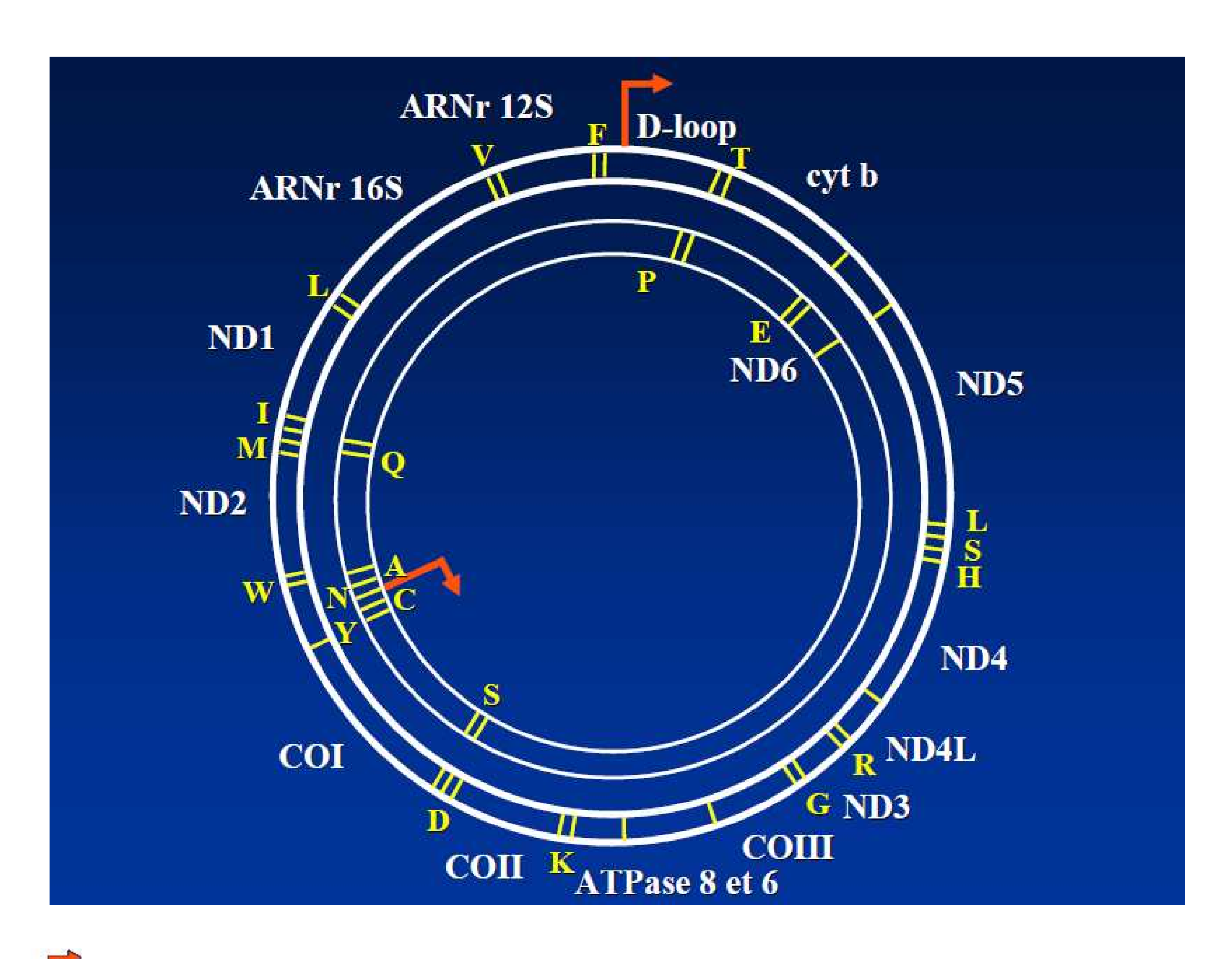
+ Patient 3

+ Patient 4

III. REFERENCE

Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion and over replication : Application to diagnosis.
Chabi B, Mousson de Camaret B, Duborjal H, Issartel J-P, Stepien G.
Clinical Chemistry 2003, 49, 1309-1317

IV. LE GENOME MITOCHONDRIAL



: origine de réplication du brin lourd (H) dans la D-loop

: origine de réplication du brin léger (L) dans la zone (WANCY) codant pour 5 ARNt

ATELIER D

Analyse histologique de la chaîne respiratoire

Anne LOMBES et Véronique LENOIR

Pièce 3514

Mise en place de l'analyse histochimique des activités succinate déshydrogénase et cytochrome c oxydase dans les tissus

Anne Lombès, Véronique Lenoir

Atelier du GDR Meetochondrie
17-19 octobre 2013
Institut Cochin-Faculté de médecine

Avec l'aide de Maryline Favier
(Plateforme Histologie de l'Institut Cochin)

Milieux de réaction

Succinate déshydrogénase

200 mM tampon phosphate (80% Na_2HPO_4, 20% KH_2PO_4)
0,1% Nitrobleu Tetrazolium
200 mM Succinate
Ajuster le pH à 7,6 et filtrer

Cytochrome c oxydase

100 mM tampon phosphate pH à 7,6
1mg/mL (~80 µM) cytochrome c type IV
1 comprimé/10 mL de DAB (cancérogène)
20 µg/mL catalase
0,25% DMSO
Ajuster le pH à 7,6 et filtrer

Matériel

Echantillons

- Coupes tissulaires (cryostat)
- Cellules en culture (fixation par séchage)

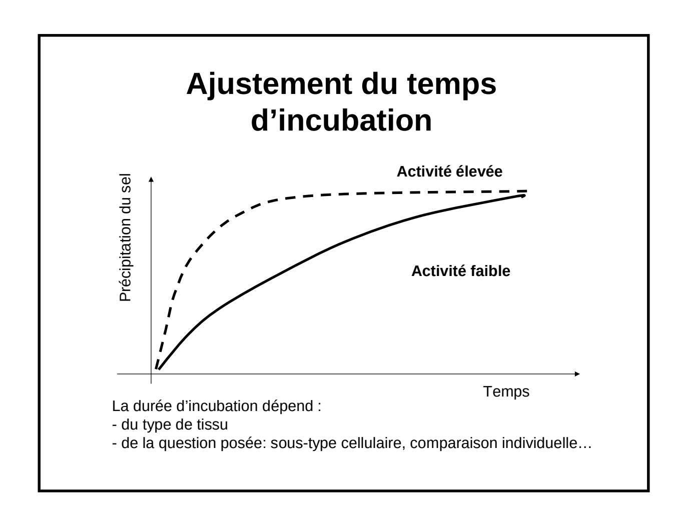
Etuve

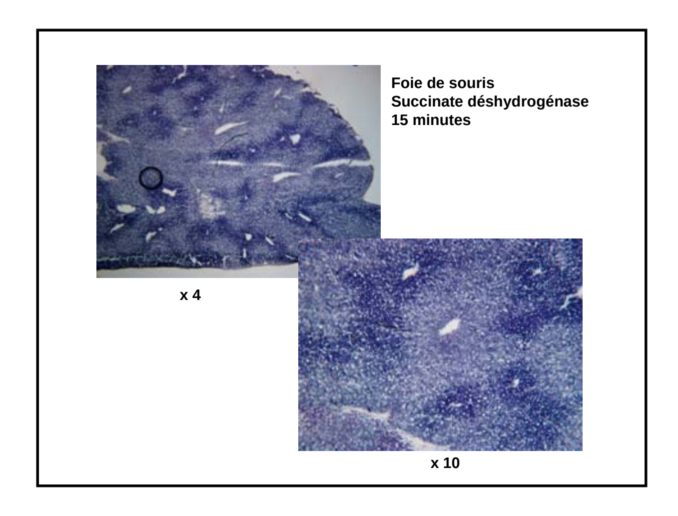
Chambres humides ou récipient adapté

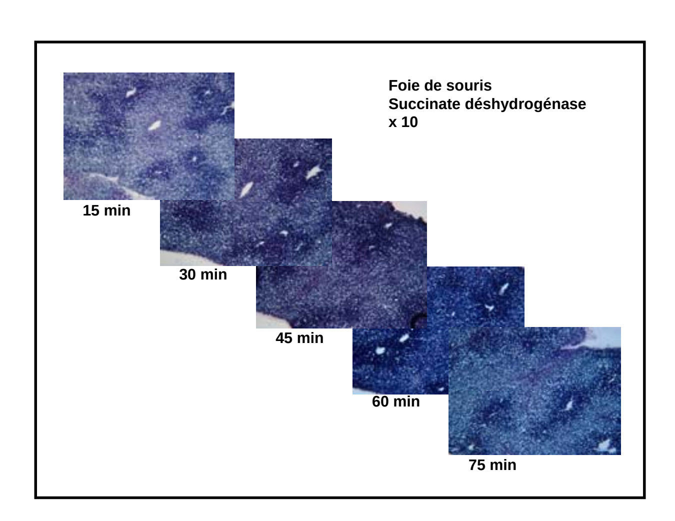
- Lames dans cuve de Coplin,
- Lamelles dans cuves de Columbia

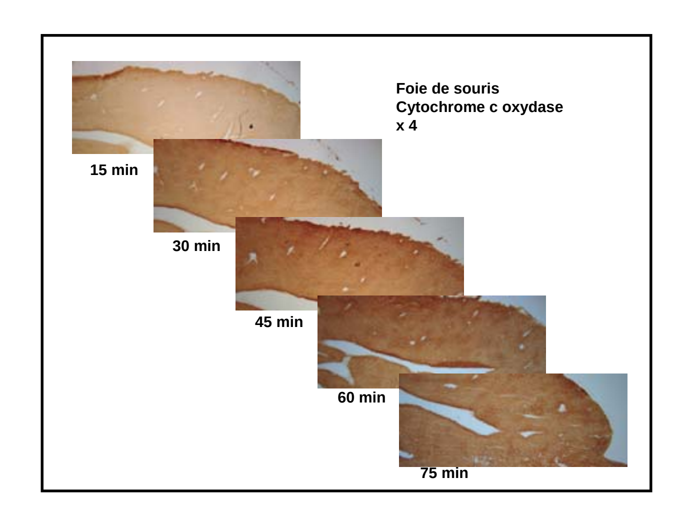


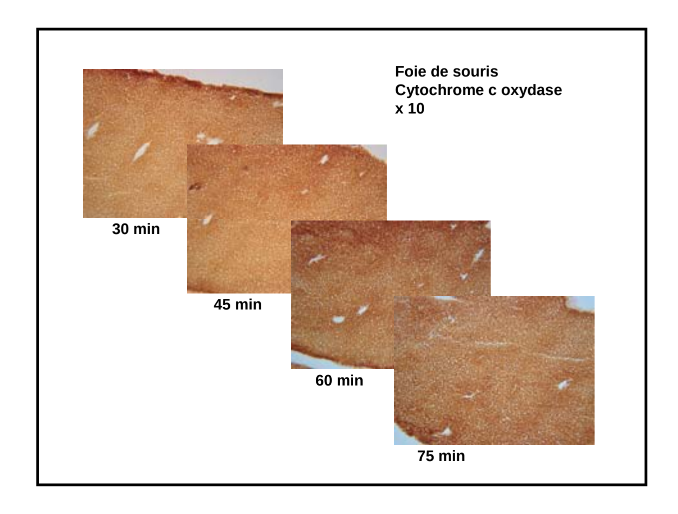


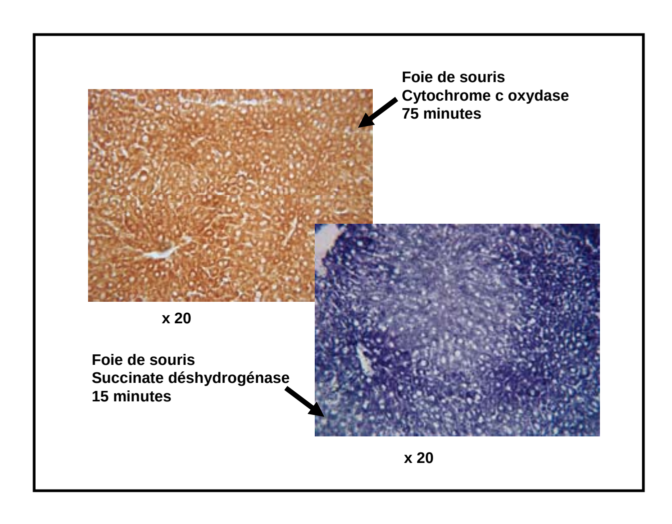

Ajustement du temps d'incubation
Activité élevée
Précipitation du sel
Activité faible
Temps
La durée d'incubation dépend :
- du type de tissu
- de la question posée: sous-type cellulaire, comparaison individuelle…

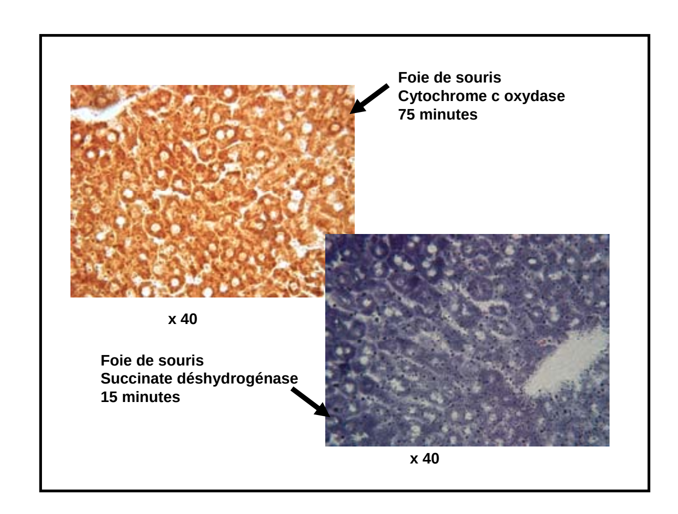

Foie de souris
Succinate déshydrogénase
15 minutes
x 4
x 10

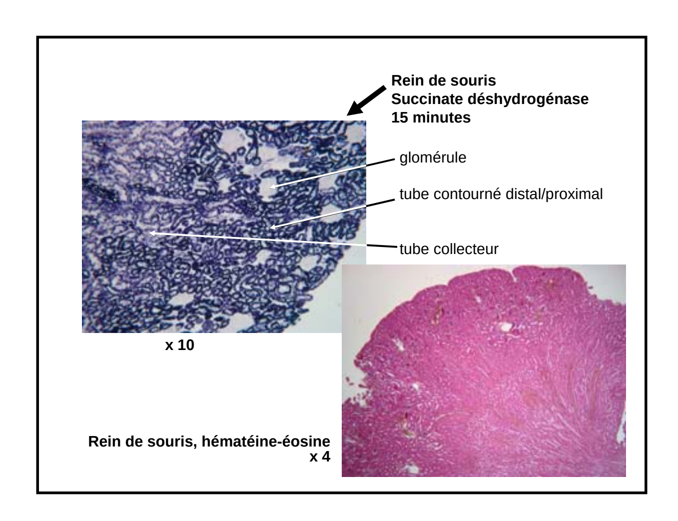

Foie de souris
Succinate déshydrogénase
x 10
15 min
30 min
45 min
60 min
75 min

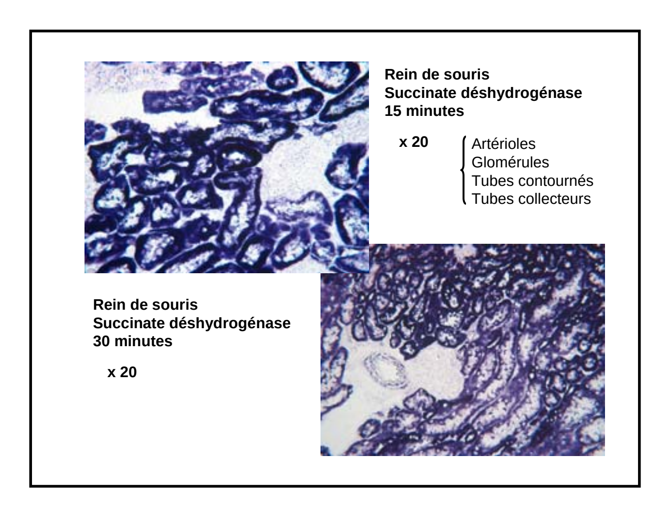

Foie de souris
Cytochrome c oxydase
x 4
15 min
30 min
45 min
60 min
75 min

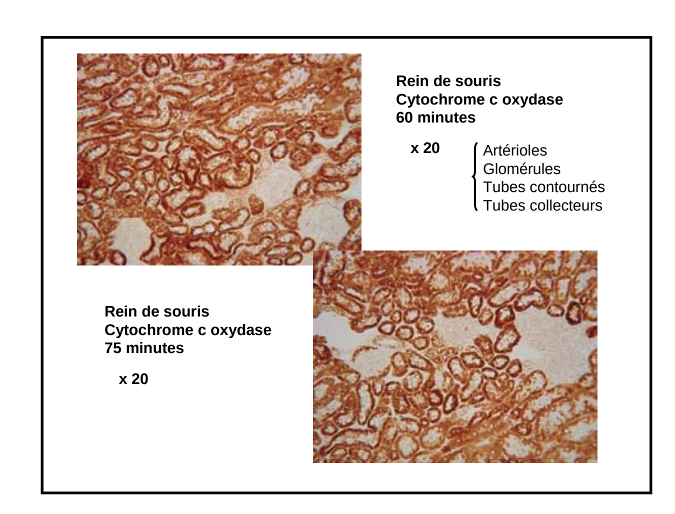

Foie de souris
Cytochrome c oxydase
x 10
30 min
45 min
60 min
75 min

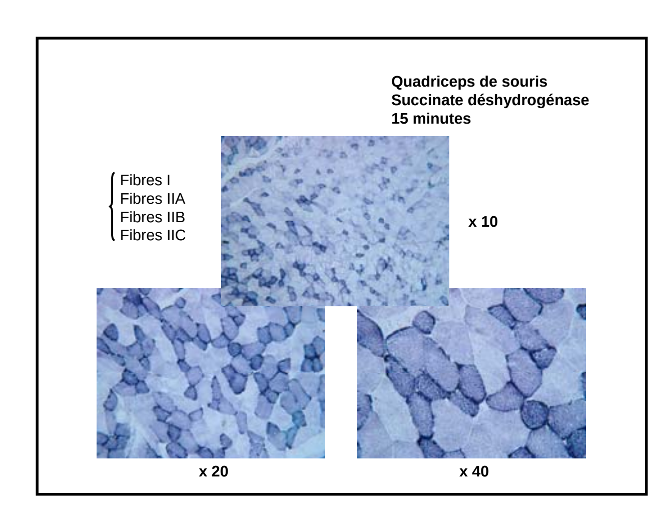

Foie de souris
Cytochrome c oxydase
75 minutes
x 20
Foie de souris
Succinate déshydrogénase
15 minutes
x 20

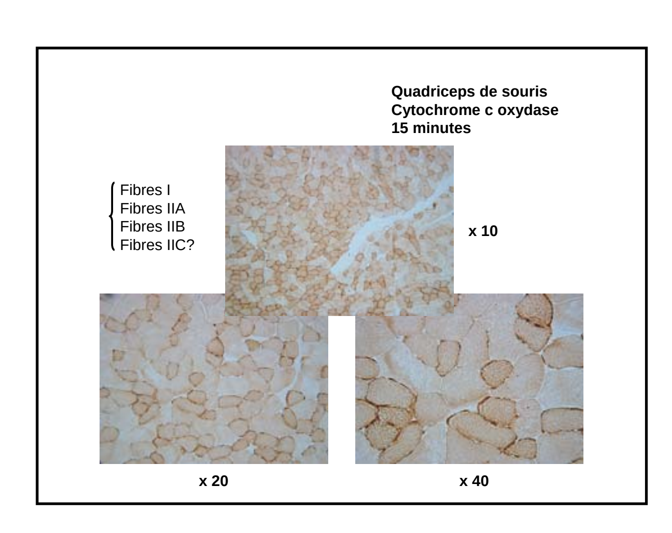

Foie de souris
Cytochrome c oxydase
75 minutes
x 40
Foie de souris
Succinate déshydrogénase
15 minutes
x 40

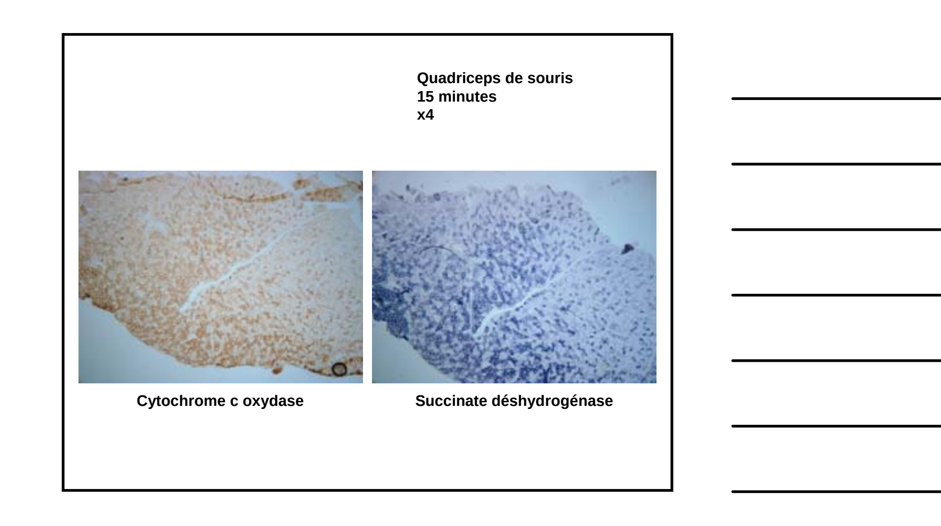

Rein de souris
Succinate déshydrogénase
15 minutes
glomérule
tube contourné distal/proximal
tube collecteur
x 10
Rein de souris, hématéine-éosine
x 4

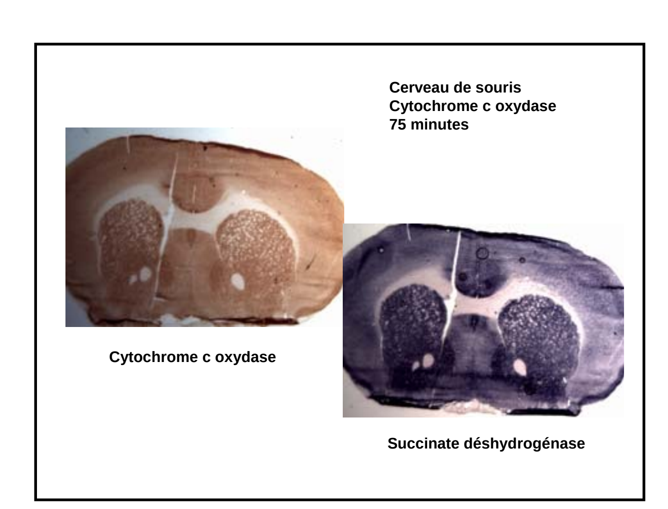

Rein de souris
Succinate déshydrogénase
15 minutes
x 20
Artérioles
Glomérules
Tubes contournés
Tubes collecteurs
Rein de souris
Succinate déshydrogénase
30 minutes
x 20

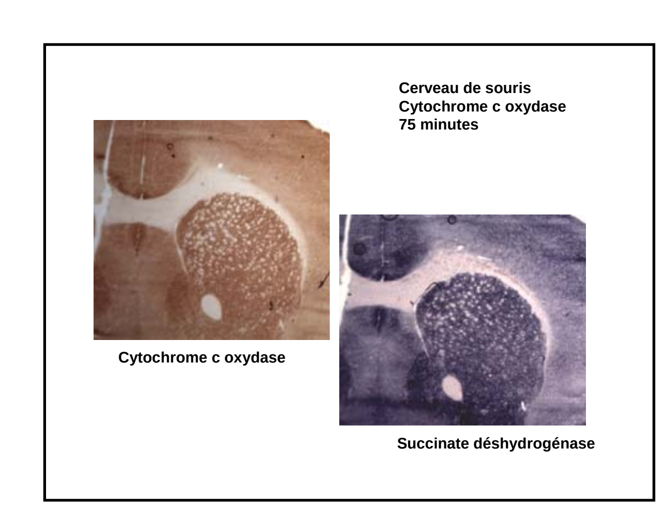

Rein de souris
Cytochrome c oxydase
60 minutes
x 20
Artérioles
Glomérules
Tubes contournés
Tubes collecteurs
Rein de souris
Cytochrome c oxydase
75 minutes
x 20

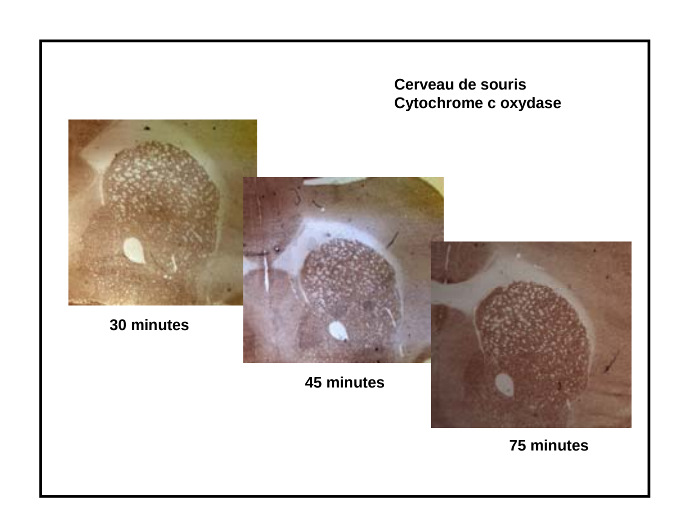

Quadriceps de souris
Succinate déshydrogénase
15 minutes
Fibres I
Fibres IIA
Fibres IIB
Fibres IIC
x 10
x 20
x 40

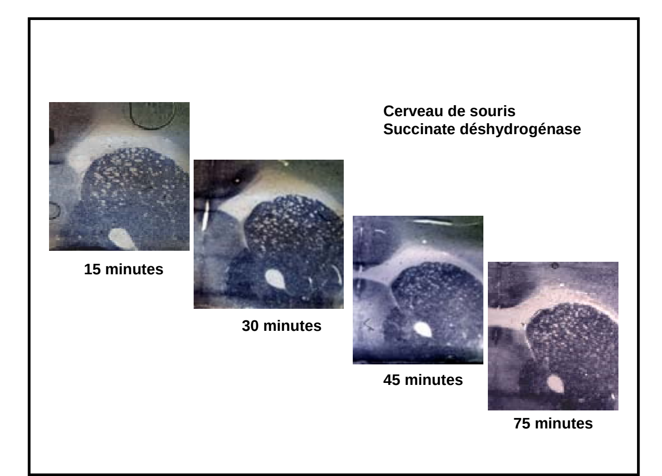

Quadriceps de souris
Cytochrome c oxydase
15 minutes
Fibres I
Fibres IIA
Fibres IIB
Fibres IIC?
x 10
x 20
x 40


Quadriceps de souris
15 minutes
x4
Cytochrome c oxydase
Succinate déshydrogénase


Cerveau de souris
Cytochrome c oxydase
75 minutes
Cytochrome c oxydase
Succinate déshydrogénase


Cerveau de souris
Cytochrome c oxydase
75 minutes
Cytochrome c oxydase
Succinate déshydrogénase





Conclusion

Préparation tissulaire++

Coupes au cryostat (pas de fixation++)
Qualité des coupes++ (épaisseur)

Hétérogénéité intra-tissulaire des activités

Préciser les cibles d'intérêt

Activité SDH>>COX (voire >>> COX)

Adapter les durées d'incubation
Co-marquage COX/SDH :
d'abord COX puis SDH+KCN

DAB est un carcinogène

Protocole d'utilisation++

DAB (source: www.unil.ch/webdav/site/unisep/shared)

Dénomination complète: 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride

Risques pour l'homme et pour l'environnement

- Dispersion, giclures: irritant pour la peau, les voies respiratoires et les yeux
- Nocif par ingestion
- Cancérogène **Suspecté** (CMR)
- Toxique pour les milieux aquatiques



Mesures de protection et règles de comportement

- Porter blouse, lunettes, gants appropriés, masque avec filtre spécifique, chaussures fermées
- Travailler sous une chapelle type «Sorbonne»
- Bien lire les étiquettes (recommandations R et S, CMR)



Conduite à tenir en cas de danger

- Renversement de petites quantités: neutraliser à la javel et rincer à l'eau. Jeter les éponges, kleenex et autres papiers absorbants dans les poubelles jaunes
- Renversement important: répandre l'absorbant approprié et traiter comme « Déchets DAB-Javel Solides»
- En cas d'incendie, formation de gaz et/ou de vapeurs toxiques
- Avertir vos collègues et interdire l'accès



Premiers secours ALARMER TEL.115

- Retirer immédiatement les vêtements souillés
- Laver soigneusement les parties touchées à l'eau et au savon (petites surfaces touchées)
- Douche de sécurité (grandes surfaces touchées)
- Douche oculaire
- En cas d'ingestion: faire boire (sauf si la personne est inconsciente)
- **NE PAS FAIRE VOMIR**





Elimination des déchets

- Neutralisation à la javel (1/3 javel 13-14%, 2/3 eau)
- Recueillir dans un contenant en plastique (type PEHD) libellé «Déchets DAB-Javel»
- Recueillir également le premier rinçage après neutralisation dans le contenant libellé «Déchets DAB-Javel»
- En cas d'élimination du produit pur, laisser dans le contenant d'origine

Informations complémentaires

- Vérifier les VME/VLE
- Stockage: armoire ventilée et bac de rétention
- Incompatible avec les oxydants
- Ne pas mélanger avec d'autres substances à cause de la réactivité de la javel (dégagement de chlore gazeux toxique)